

Université de Montréal

**Modulation de l'expression du récepteur B<sub>1</sub> des kinines  
par l'angiotensine II et l'endothéline-1  
dans des cellules musculaires lisses vasculaires**

par

**Marielle Morand-Contant**

Département de physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maître  
en physiologie

Aout 2009

© Marielle Morand-Contant, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Modulation de l'expression du récepteur B<sub>1</sub> des kinines  
par l'angiotensine II et l'endothéline-1  
dans des cellules musculaires lisses vasculaires**

présenté par :

**Marielle Morand-Contant**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Lucie Parent, présidente-rapporteure  
Réjean Couture, directeur de recherche  
Madhu Anand-Srivastava, codirectrice  
Marc Servant, membre du jury

## Résumé

Le stress oxydatif est impliqué dans l'expression du récepteur B<sub>1</sub> des kinines (RB<sub>1</sub>) dans différents modèles de diabète et d'hypertension. Puisque l'angiotensine II (Ang II) et l'endothéline-1 (ET-1) sont des peptides prooxydants impliqués dans les maladies cardiovasculaires, leur contribution dans l'augmentation de l'expression du RB<sub>1</sub> a été étudiée dans des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Le QRT-PCR et l'immunobuvardage de type Western ont été utilisés pour mesurer l'expression du RB<sub>1</sub> dans des CMLV dérivées de la lignée A10 et de l'aorte de rats Sprague-Dawley. Cette étude montre que l'Ang II augmente l'expression du RB<sub>1</sub> (ARNm et protéine) en fonction de la concentration et du temps (maximum 1 µM entre 3-6 h). Cette augmentation implique le récepteur AT<sub>1</sub>, la PI3K et le NF-κB, mais non le récepteur AT<sub>2</sub> et ERK1/2. Aussi, le récepteur ET<sub>A</sub> de l'ET-1 est impliqué dans la réponse à l'Ang II à 6-8 h et non à 1-4 h. Par contre, l'ET-1 augmente l'expression du RB<sub>1</sub> (maximum 2-4 h) via la stimulation des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. L'augmentation du RB<sub>1</sub> causée par l'Ang II et l'ET-1 est bloquée par les antioxydants (N-acétyl-cystéine et diphénylèneiodonium). Ces résultats suggèrent que l'Ang II induit le RB<sub>1</sub> dans les CMLV par le récepteur AT<sub>1</sub> dans la première phase, et par la libération d'ET-1 (majoritairement par ET<sub>A</sub>) dans la phase tardive, via le stress oxydatif et l'activation de la PI3K et du NF-κB. Ces résultats précisent le mécanisme impliqué dans la surexpression du RB<sub>1</sub> ayant des effets néfastes dans le diabète et l'hypertension.

**Mots-clés :** récepteur B<sub>1</sub> des kinines, angiotensine II, endothéline-1, stress oxydatif, cellule du muscle lisse vasculaire, ERK1/2, PI3K et NF-κB.

## Abstract

Oxidative stress is involved in the overexpression of kinin B<sub>1</sub> receptor (B<sub>1</sub>R) in various models of diabetes and hypertension. Since angiotensin II (Ang II) and endothelin-1 (ET-1) are pro-oxidative peptides involved in cardiovascular diseases, their contribution in increasing the expression of B<sub>1</sub>R was examined in vascular smooth muscle cells (VSMC). QRT-PCR and Western blot analysis were used to measure the expression of B<sub>1</sub>R in VSMC derived from A10 cell line and the aorta of Sprague-Dawley rats. This study shows that Ang II increases the expression of B<sub>1</sub>R (mRNA and protein) in a concentration- and time-dependent manner (maximum 1  $\mu$ M between 3-6 h). This increase involves AT<sub>1</sub> receptor, PI3K and NF- $\kappa$ B, but not AT<sub>2</sub> receptor and ERK1/2. Moreover, ET<sub>A</sub> receptor is involved in the effect of Ang II at 6-8 h but not at 1-4 h. However, ET-1 increases expression of B<sub>1</sub>R (maximum 2-4 h) via stimulation of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors. Ang II and ET-1-induced increase expression of B<sub>1</sub>R is blocked by antioxidants (N-acetyl-L-cysteine and diphenyleneiodonium). These results suggest that Ang II induces B<sub>1</sub>R in VSMC by AT<sub>1</sub> receptor in the first phase and by releasing ET-1 (predominantly by ET<sub>A</sub> receptor) in the late phase, via oxidative stress and activation of PI3K and NF- $\kappa$ B. These results clarify the mechanism involved in the overexpression of B<sub>1</sub>R which has adverse effects in diabetes and hypertension.

**Keywords :** kinin B<sub>1</sub> receptor, angiotensin II, endothelin-1, oxidative stress, vascular smooth muscle cell, ERK1/2, PI3K and NF- $\kappa$ B.

# Table des matières

<b>CHAPITRE 1 – INTRODUCTION</b> .....	1
1. Le système cardiovasculaire .....	2
1.1. Le cœur .....	2
1.2. Les vaisseaux sanguins .....	3
1.2.1. Les types de vaisseaux sanguins .....	3
1.2.1.1. Les artères et les artérioles .....	3
1.2.1.2. Les capillaires .....	4
1.2.1.3. Les veines et les veinules .....	4
1.2.2. La composition d'un vaisseau sanguin .....	6
1.2.2.1. La tunica intima (endothélium).....	6
1.2.2.2. La tunica média (musculaire).....	6
1.2.2.3. La tunica adventitia (conjonctive).....	7
1.3. La pression artérielle .....	8
1.3.1. La régulation vasculaire de la pression artérielle.....	8
1.3.2. Le baroréflexe et le système nerveux autonome .....	10
1.3.3. Les hormones vasoactives et les facteurs endothéliaux .....	11
1.3.3.1. L'adrénaline et la noradrénaline.....	12
1.3.3.2. La vasopressine .....	13
1.3.3.3. L'angiotensine II .....	14
1.3.3.4. L'endothéline .....	14
1.3.3.5. Le monoxyde d'azote.....	15
1.3.3.6. La bradykinine .....	15
1.3.3.7. La prostacycline .....	15
1.3.3.8. Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium .....	16
2. Le système kallikréine-kinine .....	17
2.1. La formation des kinines .....	17
2.2. Les récepteurs des kinines.....	18
2.2.1. Le récepteur B <sub>2</sub> .....	19
2.2.2. Le récepteur B <sub>1</sub> .....	19
2.2.2.1. Le mécanisme de régulation du récepteur B <sub>1</sub> .....	19

2.3.	Les voies de signalisation des récepteurs des kinines .....	22
2.4.	Les actions vasculaires des récepteurs des kinines .....	24
2.5.	Le catabolisme des kinines .....	25
2.5.1.	Les aminopeptidases .....	25
2.5.2.	Les carboxypeptidases .....	26
2.5.2.1.	Les kininases I.....	26
2.5.2.2.	Les kininases II .....	26
3.	Les vasozeptides .....	27
3.1.	L'angiotensine II.....	27
3.1.1.	Les récepteurs de l'angiotensine II .....	28
3.1.2.	Les voies de signalisation du récepteur AT <sub>1</sub> .....	28
3.1.2.1.	La voie de l'IP <sub>3</sub> et du DAG .....	29
3.1.2.2.	Les voies des MAPK.....	30
3.1.2.3.	La voie de la PI3K .....	31
3.2.	L'endothéline .....	34
3.2.1.	La synthèse de l'endothéline-1.....	34
3.2.2.	Les récepteurs de l'endothéline.....	36
3.2.2.1.	Le récepteur ET <sub>A</sub> .....	36
3.2.2.2.	Le récepteur ET <sub>B</sub> .....	37
3.2.3.	Les voies de signalisation de l'endothéline-1 .....	37
3.3.	Lien entre les vasozeptides et le récepteur B <sub>1</sub> des kinines.....	39
4.	Le stress oxydatif .....	40
4.1.	Les fonctions des espèces réactives oxygénées .....	41
4.2.	Les sources vasculaires de production des espèces réactives oxygénées .....	42
4.2.1.	La NAD(P)H oxydase .....	43
4.2.2.	L'oxyde nitrique synthase découplée.....	46
4.2.3.	La mitochondrie .....	46
4.2.4.	La xanthine oxydase.....	47
4.3.	Les voies d'élimination des espèces réactives oxygénées .....	47
4.3.1.	La superoxyde dismutase et la catalase.....	47
4.3.2.	Les molécules antioxydantes.....	48
4.4.	Lien entre le stress oxydatif et le récepteur B <sub>1</sub> des kinines.....	48
5.	Hypothèse et objectifs.....	50

<b>CHAPITRE 2 – ARTICLE SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>51</b>
<b>CHAPITRE 3 – DISCUSSION ET CONCLUSION.....</b>	<b>91</b>
6. Discussion .....	92
7. Perspectives.....	97
8. Conclusion .....	99
9. Bibliographie.....	101



## Liste des figures

<b>Figure 1: Le système cardiovasculaire.</b> .....	5
<b>Figure 2 : La structure des vaisseaux sanguins.</b> .....	7
<b>Figure 3: La pression sanguine dans diverses régions du système cardiovasculaire.</b> ....	9
<b>Figure 4: Les médiateurs endothéliaux qui permettent la contraction ou la relaxation des cellules du muscle lisse vasculaire.</b> .....	12
<b>Figure 5: Mécanisme de formation des kinines responsables de l'activation des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines.</b> .....	18
<b>Figure 6: Mécanisme d'activation du facteur de transcription NF-<math>\kappa</math>B.</b> .....	21
<b>Figure 7: Mécanismes de signalisation des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines.</b> .....	23
<b>Figure 8: Sites d'actions des enzymes catalytiques des kinines.</b> .....	27
<b>Figure 9: Signalisation du récepteur AT<sub>1</sub> de l'angiotensine II.</b> .....	33
<b>Figure 10: Synthèse de l'endothéline-1.</b> .....	35
<b>Figure 11: Voies de signalisation de l'endothéline-1.</b> .....	38
<b>Figure 12: Voies de production et d'éliminations des espèces réactives oxygénées.</b> ....	42
<b>Figure 13: Structure de la NAD(P)H oxydase.</b> .....	43
<b>Figure 14: Rôle de l'endothéline-1 dans la production du stress oxydatif par l'angiotensine II.</b> .....	45
<b>Figure 15: Expression du récepteur B<sub>1</sub> des kinines dans des CMLV exposées à une concentration de 26 mM de glucose pendant 1 à 5 jours.</b> .....	94
<b>Figure 16: Expression protéique du RB<sub>1</sub> dans l'aorte de rat traité avec 10 % de glucose dans l'eau à boire.</b> .....	96
<b>Figure 17. Mécanisme de signalisation suggéré dans l'augmentation du RB<sub>1</sub> des kinines par l'angiotensine II et l'endothéline-1 sur les CMLV.</b> .....	100



## Liste des abréviations

Abréviation	Signification
1K-1C	« <i>one-kidney-one-clip</i> »
ADN	acide désoxyribonucléique
AMPC	3',5'adénosine monophosphate cyclique
Ang II	angiotensine II
ANP	peptide natriurétique auriculaire
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
BH <sub>4</sub>	tétrahydrobioptérine
BK	bradykinine
CMLV	cellules du muscle lisse vasculaire
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
COX	cyclooxygénase
Cu/Zn-SOD	superoxyde dismutase à cuivre-zinc
DAG	diacylglycérol
ECA	enzyme de conversion de l'angiotensine I
ECE	enzyme de conversion de l'endothéline
EGF	facteur de croissance épidermique
EGF-R	récepteur de facteur de croissance épidermique
EDHF	facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
eNOS	synthase du monoxyde d'azote endothéliale
EPN	endopeptidase neutre
ERO	espèces réactives oxygénées
ERK1/2	« <i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i> »
ET	endothéline

ET-1	endothéline-1
ET-2	endothéline-2
ET-3	endothéline-3
FAK	kinases d'adhésion focale
Fe-SOD	superoxyde dismutase au fer
GCs	guanylyl cyclase soluble
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GDP	guanosine diphosphate
GPCR	récepteurs couplés aux protéines G
Grb2	protéine de liaison de facteurs de croissances 2
GTP	guanosine triphosphate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène
IκB	inhibiteur du NF-κB
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-triphosphate
iNOS	synthase de monoxyde d'azote inducible
JAK	kinase de la famille janus
JNK	kinase N-terminale c-jun
MAPK	protéines-kinases activées par les mitogènes
MAPKKK	MAPK kinase kinase
MEK	MAPK kinase
Mn-SOD	superoxyde dismutase à manganèse
NAC	N-acétyl-cystéine
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB	facteur de transcription nucléaire kappa B
nNOS	synthase de monoxyde d'azote neuronale

NO	monoxyde d'azote
NOS	synthase de monoxyde d'azote
O <sub>2</sub>	oxygène
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	anion super oxide
ONOO <sup>-</sup>	peroxynitrite
p70 <sup>S6K</sup>	protéine ribosomale S6 kinase de 70 kDa
PDGF-R	récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGI <sub>2</sub>	prostacycline
PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKA	protéine kinase A
PKB	protéine kinase B
PKC	protéine kinase C
PLA <sub>2</sub>	phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	phospholipase C
PLCβ	phospholipase Cβ
PLCγ	phospholipase Cγ
PLD	phospholipase D
Pyk2	« <i>Proline-rich tyrosine kinase 2</i> »
RB <sub>1</sub>	récepteur B <sub>1</sub> des kinines
RB <sub>2</sub>	récepteur B <sub>2</sub> des kinines
SHR	rat spontanément hypertendu
SOD	superoxyde dismutase
Sos	« <i>Son Of Sevenless</i> »
XO	xanthine oxydase

*Aux membres de ma famille,*

*C'est vous qui m'avez encouragée à poursuivre mes rêves  
et qui m'avez aidée à me rendre où je suis aujourd'hui.*

## Remerciements

J'aimerais remercier sincèrement D<sup>r</sup> Réjean Couture pour sa grande disponibilité, son soutien et son côté humain, qui ont facilité nos discussions et mon cheminement au sein de son équipe. Je le remercie de m'avoir donné ce merveilleux projet et de m'avoir transmis son goût d'aller toujours plus loin dans mon travail. Je tiens également à remercier D<sup>re</sup> Madhu Anand-Srivastava de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir fait confiance et de m'avoir encouragée dans mes démarches scientifiques.

Je tiens à remercier D<sup>re</sup> Yuan Li et Jacques Sénécal, qui m'ont beaucoup aidée tout au long de ces travaux par leur grand soutien technique et scientifique. Je souhaite remercier particulièrement mes collègues et amies D<sup>re</sup> Magda Descorbeth, Yessica Gomez et Jasmine El Andalousie pour leur grande complicité et leur accueil chaleureux qui ont rendu mon travail en laboratoire encore plus agréable. Je remercie également tous les membres de mes deux laboratoires pour les échanges constructifs qui m'ont permis d'avancer dans mes recherches. Merci à tous les membres du département de physiologie, incluant professeurs, étudiants, assistants de recherche et secrétaires, plus particulièrement à Christiane Laurier, Johanne Payette et Annabelle Côté pour leur aide et leur appui.

Je remercie la Faculté des études supérieures et postdoctorale (FESP), le Groupe de recherche universitaire sur le médicament (GRUM), Sanofi-aventis et le Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ) pour leurs soutiens financiers versés sous la forme de bourses d'études. Le soutien financier de ce travail a été assuré par les subventions de recherche des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) octroyées aux D<sup>rs</sup> Réjean Couture et Madhu Anand-Srivastava.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille et mes amis pour m'avoir encouragée, aidée et appuyée tout au long de cette maîtrise. Je remercie mon mari, Jérémie Laplante, pour ses compétences informatiques (qui m'ont été extrêmement utiles) ainsi que pour son amour et sa tendresse, qui m'ont permis de surmonter les moments difficiles. Je tiens également à remercier plus particulièrement ma mère, Chantal Contant, pour ses compétences linguistiques, mais encore plus pour son amour inconditionnel et ses encouragements dans la réalisation de ces études.

## **CHAPITRE 1 – INTRODUCTION**

# **1. Le système cardiovasculaire**

Le système cardiovasculaire est l'un des systèmes les plus importants du corps humain. Sa fonction principale est de transporter le sang afin d'assurer l'approvisionnement des tissus en nutriments et en oxygène, et de les débarrasser de leurs déchets métaboliques. Le système cardiovasculaire est aussi la voie que les hormones empruntent pour atteindre leur organe cible (Guyton et Hall, 2003). Il comprend le cœur et les différents vaisseaux sanguins (figure 1).

## **1.1. Le cœur**

Chez les vertébrés supérieurs, le cœur accomplit la fonction de deux pompes en parallèle. La pompe droite permet au sang désoxygéné de circuler dans les poumons (circulation pulmonaire), tandis que la pompe gauche permet au sang oxygéné de rejoindre le reste de l'organisme (circulation systémique). En pompant le sang, le cœur exerce une pression sur les vaisseaux sanguins. Cette pression est nettement plus élevée dans la circulation systémique que dans la circulation pulmonaire (Sherwood, 2004). Comme on le verra pour les vaisseaux sanguins, le cœur est composé de trois couches : l'endocarde, le myocarde et l'épicarde. L'endocarde, la couche la plus interne, est en contact direct avec le sang. Cette couche est formée d'un épithélium et de tissu conjonctif collagénique et élastique (Sherwood, 2004). Le myocarde, la couche la plus épaisse, est composé principalement de cellules musculaires que l'on nomme cardiomyocytes. Le ventricule gauche a un myocarde particulièrement épais, puisque c'est grâce à sa puissance de contraction musculaire que le sang voyage dans la circulation systémique (Sherwood, 2004). C'est aussi dans le myocarde que se trouve le système de conduction nerveuse qui permet au cœur de s'autoactiver et de synchroniser les séquences du cycle cardiaque (Sherwood, 2004). De plus, on y retrouve des vaisseaux coronariens, qui servent à irriguer correctement les cellules cardiaques, et des nerfs du système nerveux autonome, autant du sympathique que du parasympathique, qui modulent le rythme cardiaque (Sherwood,

2004). Finalement, la couche la plus externe est l'épicaire, qui est composé majoritairement de tissu conjonctif fibroélastique (Sherwood, 2004).

Le cœur n'est pas seulement un muscle qui pompe le sang, c'est aussi une glande endocrine. Les oreillettes du cœur sont connues pour produire une hormone peptidique : le peptide natriurétique auriculaire (*atrial natiuretic peptide*, ANP) (Guyton et Hall, 2003). Lorsqu'il y a une augmentation de la pression artérielle caractérisée par une augmentation du retour veineux et du débit cardiaque, les oreillettes subissent une distension mécanique qui favorise la libération de l'ANP (Guyton et Hall, 2003). Ce peptide stimule l'excrétion de sodium et d'eau par les reins, ce qui permet la diminution du volume sanguin et, par conséquent, une diminution de la pression artérielle (Guyton et Hall, 2003). En plus de diminuer la pression artérielle par diminution du volume sanguin, l'ANP favorise la vasodilatation (Anand-Srivastava et Trachte, 1993).

## **1.2. Les vaisseaux sanguins**

Les vaisseaux sanguins forment un réseau de communication que le sang emprunte pour rejoindre les différents organes.

### **1.2.1. Les types de vaisseaux sanguins**

Il existe différents types de vaisseaux sanguins, qui se différencient par leurs compositions cellulaires, leurs diamètres et le taux d'oxygénation du sang qu'ils transportent.

#### **1.2.1.1. Les artères et les artérioles**

Les artères sont les vaisseaux de gros calibre qui partent du cœur et qu'on caractérise de vaisseaux de conductance et de réservoirs de pression. Elles ont une paroi solide et le flux du sang y est rapide (Guyton et Hall, 2003). Les artères sont reliées à des vaisseaux de moyen calibre : les artérioles. Les artérioles ont souvent un ratio lumière/paroi



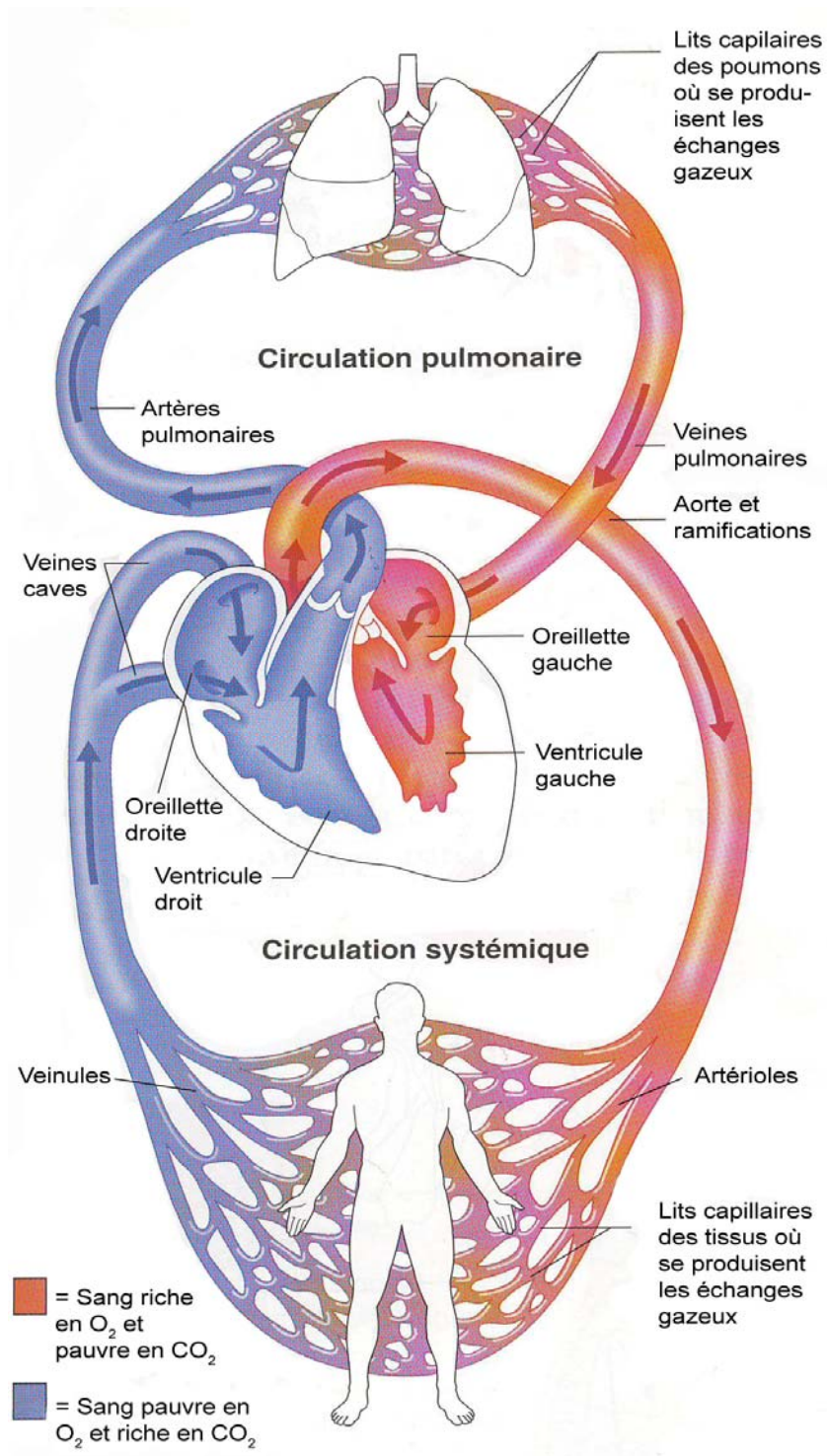
qui est plus faible que celui retrouvé dans les artères. Les artérioles sont les vaisseaux que l'on caractérise de vaisseaux de résistance, car elles ont une paroi épaisse et puissante leur permettant de réduire la pression du sang avant qu'il entre dans les capillaires (Sherwood, 2004). De plus, une manière d'ajuster l'apport sanguin qui atteint un organe cible est de modifier le calibre des vaisseaux artériels qui distribuent le sang à cet organe (Guyton et Hall, 2003).

#### **1.2.1.2. Les capillaires**

Les capillaires joignent le réseau artériel au réseau veineux. Ils permettent au sang de faire de nombreux échanges (gazeux, nutritionnels, métaboliques, hormonaux) avec les cellules environnantes (Guyton et Hall, 2003). Les capillaires pulmonaires larguent le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) dans les poumons et captent l'oxygène ( $\text{O}_2$ ) de l'air inspiré. De leur côté, les capillaires de la circulation systémique livrent l' $\text{O}_2$  et les nutriments aux tissus et les débarrassent de leurs déchets métaboliques et du  $\text{CO}_2$  (Sherwood, 2004).

#### **1.2.1.3. Les veines et les veinules**

Les veinules sont des vaisseaux de moyen calibre qui sont reliés aux capillaires. Les veinules ramènent le sang au cœur en se reliant aux veines, qui sont des vaisseaux de plus gros calibre rejoignant le cœur (Guyton et Hall, 2003). Les veines travaillent souvent contre la gravité et renferment des valves qui empêchent la circulation à rebours. Les veines sont des vaisseaux capables de se contracter ou de se dilater, et constituent le principal réservoir de sang (Guyton et Hall, 2003).



**Figure 1: Le système cardiovasculaire.**

[Modifié de Marieb, 2008]

### **1.2.2. La composition d'un vaisseau sanguin**

La paroi des vaisseaux comprend trois couches (figure 2), dont l'épaisseur relative et la constitution varient avec la fonction particulière accomplie par le type de vaisseau sanguin.

#### **1.2.2.1. La tunica intima (endothélium)**

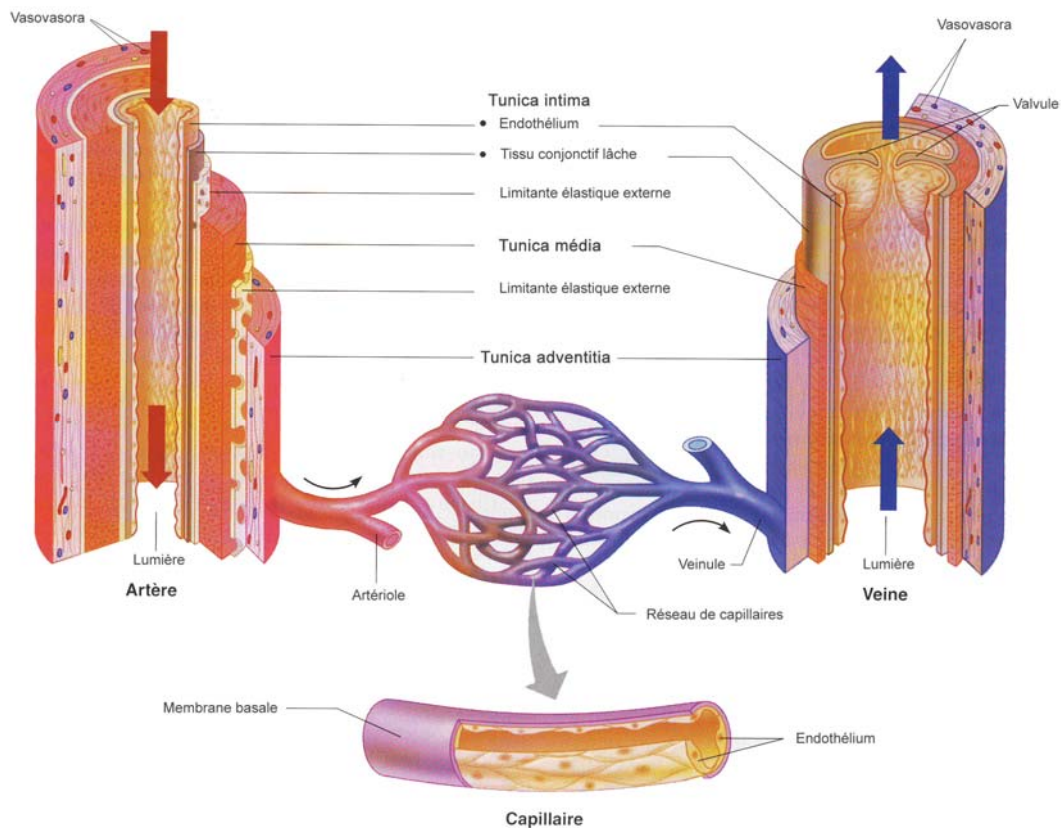
La tunica intima comprend des cellules endothéliales qui forment la première couche de cellules en contact avec la lumière du vaisseau. Cet endothélium n'a pas vraiment de fonction structurale, car il réduit au minimum la résistance à la circulation, mais il a une grande fonction sécrétrice qui régule le tonus vasomoteur et ainsi la circulation du sang dans les vaisseaux (Marieb, 2008). Tous les vaisseaux sanguins sont dotés d'une couche endothéliale. De plus, afin de faciliter les échanges, les capillaires sont composés uniquement d'une couche mince d'endothélium (Campbell et Reece, 2007; Guyton et Hall, 2003). Cet endothélium a un grand rôle dans la régulation du tonus vasculaire, car il peut libérer plusieurs facteurs endothéliaux autant vasoconstricteurs (angiotensine II, endothéline-1, thromboxane A<sub>2</sub> et prostaglandine H<sub>2</sub>) que vasodilatateurs (monoxyde d'azote, bradykinine, prostacycline et facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium).

#### **1.2.2.2. La tunica média (musculaire)**

La tunica média, la couche du centre de la paroi vasculaire, contient des cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) disposées en feuillets concentriques. Il peut aussi y avoir du collagène et de l'élastine produits par ces CMLV (Marieb, 2008). La tunica média est la couche la plus importante des artères et des artérioles, car elle permet de résister et de s'adapter à des gradients de pression (Campbell et Reece, 2007). Les veinules et les veines se distinguent des artérioles et des artères par un rapport lumière/paroi beaucoup plus élevé et par une tunica adventitia beaucoup plus importante au détriment de la tunica média (Marieb, 2008).

### 1.2.2.3. La tunica adventitia (conjonctive)

La tunica adventitia, la couche externe ou superficielle des vaisseaux sanguins, est majoritairement composée de tissus conjonctifs, c'est-à-dire des fibres de collagène et d'élastine (Marieb, 2008). On y retrouve des vasovasoras (petits vaisseaux sanguins), des petits vaisseaux lymphatiques et des fibres du système nerveux autonome et du système nerveux sensoriel (Marieb, 2008).



**Figure 2 : La structure des vaisseaux sanguins.**

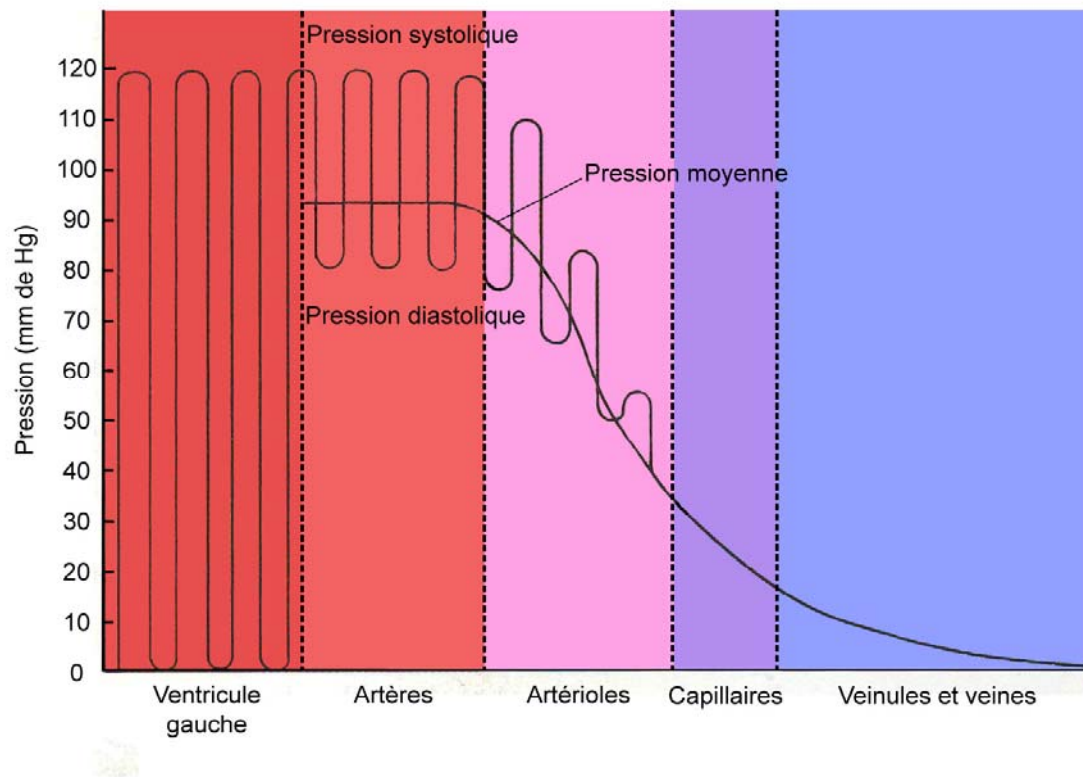
[Modifié de Marieb, 2008]

### **1.3. La pression artérielle**

La pression artérielle est déterminée par le produit du débit cardiaque et de la résistance totale périphérique. Le débit cardiaque est le produit du volume d'éjection et de la fréquence cardiaque. La résistance totale périphérique est la force qui s'oppose à l'écoulement du sang et résulte de la friction du sang sur la paroi du vaisseau (Guyton et Hall, 2003; Sherwood, 2004). Trois facteurs peuvent influencer la résistance périphérique : la viscosité du sang, la longueur totale des vaisseaux et le diamètre de ceux-ci. Puisque le nombre de globules rouges qui détermine la viscosité du sang et la longueur totale des vaisseaux sont normalement constants, c'est majoritairement le diamètre du vaisseau qui influence la résistance totale périphérique (Marieb, 2008). Pour un adulte sain, la pression systolique (lors de la contraction des ventricules) est d'environ 120 mm Hg et la pression diastolique (lors de la relaxation des ventricules) est d'environ 80 mm Hg. Donc, on estime que la pression artérielle normale est d'environ 120/80 mm Hg (Sherwood, 2004). Une mauvaise régulation du tonus musculaire artériel aboutit à l'hypertension artérielle (pression plus élevée que la normale; 140/90 mm Hg) ou à l'hypotension (pression plus faible que la normale; 100/60 mm Hg) (Sherwood, 2004). Bref, une variation du débit cardiaque ou de la résistance totale périphérique affectera la pression artérielle.

#### **1.3.1. La régulation vasculaire de la pression artérielle**

La pression artérielle systémique est régulée majoritairement par les artérioles, car elles ont une grande capacité de résistance. Ainsi, les artérioles permettent à la pression systolique et diastolique de former une seule et unique onde de pression non pulsatile (Sherwood, 2004), afin de protéger les capillaires dépourvus de musculature (figure 3).



**Figure 3: La pression sanguine dans diverses régions du système cardiovasculaire.**

[Adapté de Sherwood, 2004]

L'ajustement du diamètre des vaisseaux peut se faire par vasoconstriction ou par vasorelaxation. La vasoconstriction est l'augmentation de la contraction des cellules du muscle lisse qui composent la paroi du vaisseau sanguin, ce qui mène à la diminution de la lumière du vaisseau, à l'augmentation de la résistance et à la diminution du flux sanguin à travers le vaisseau (Marieb, 2008). La vasoconstriction a plusieurs origines : une augmentation de l'activité myogénique, une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique, la présence de peptides vasoactifs (endothéline, angiotensine II ou vasopressine), le froid, etc. (Sherwood, 2004). À l'opposé, la vasodilatation est la diminution de la contraction des cellules du muscle lisse qui composent la paroi du vaisseau sanguin, ce qui mène à l'augmentation de la lumière du vaisseau, à une diminution de la

résistance et à l'augmentation du flux sanguin à travers le vaisseau. Les causes de la vasodilatation peuvent être variées : diminution de l'activité myogénique, la présence de monoxyde d'azote , la diminution de l'activité du système nerveux sympathique, la présence d'histamines ou de prostaglandines, la chaleur, etc. (Sherwood, 2004). Bref, ces mécanismes de contraction et de relaxation, dont les vaisseaux artériels sont pourvus, permettent le contrôle du tonus vasculaire et, par conséquent, influencent la pression sanguine.

### **1.3.2. Le baroréflexe et le système nerveux autonome**

La pression artérielle est contrôlée à court terme par l'activité des barorécepteurs. L'augmentation de pression étire les barorécepteurs localisés dans les sinus carotidiens et la crosse aortique, ce qui stimule les terminaisons nerveuses des fibres sensorielles qui transmettent l'information au système nerveux central (Sherwood, 2004). Les barorécepteurs des sinus carotidiens transmettent leurs influx via le nerf de Henring, puis par le nerf glossopharyngien jusqu'au centre vasomoteur (tractus solitaire) situé dans le bulbe rachidien (Guyton et Hall, 2003). Les signaux issus des barorécepteurs de la crosse aortique sont transmis à ce même centre vasomoteur, mais, cette fois-ci, par le nerf vague (Guyton et Hall, 2003). Tous ces influx nerveux inhibent le centre vasoconstricteur du bulbe (constitué de neurones qui régulent l'activité sympathique) et activent le centre vagal parasympathique (Guyton et Hall, 2003). Ainsi, les effets qui en résultent sont la vasodilatation des vaisseaux de la circulation périphérique par diminution de l'activité sympathique vasoconstrictrice et une diminution de la fréquence et de la force des contractions cardiaques par le système parasympathique (Sherwood, 2004). Bref, la stimulation des barorécepteurs par une augmentation de la pression artérielle déclenche par la voie réflexe une diminution de la pression artérielle en diminuant le débit cardiaque et la résistance périphérique totale (Sherwood, 2004). En revanche, une diminution de la pression artérielle inhibe les barorécepteurs, ce qui permet au centre vasoconstricteur d'opérer de façon optimale sans contrainte parasympathique (Guyton et Hall, 2003).

En condition normale, le système sympathique exerce une action vasoconstrictrice sur les vaisseaux artériels, soit par un mécanisme direct qui est nerveux ou par un mécanisme indirect qui est hormonal. Le mécanisme direct se caractérise par une libération de la noradrénaline par les terminaisons nerveuses sympathiques, ce qui permet l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques situés sur le muscle lisse des artéioles, causant la vasoconstriction (Sherwood, 2004). Ainsi, une augmentation exagérée du système nerveux sympathique entraîne<sup>1</sup> l'hypertension (Sherwood, 2004). Le mécanisme indirect se caractérise par une stimulation de la glande médullosurrénale, qui sécrète les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) dans la circulation sanguine. Ces hormones vont agir sur le système cardiovasculaire et augmenter la pression artérielle (Marieb, 2008).

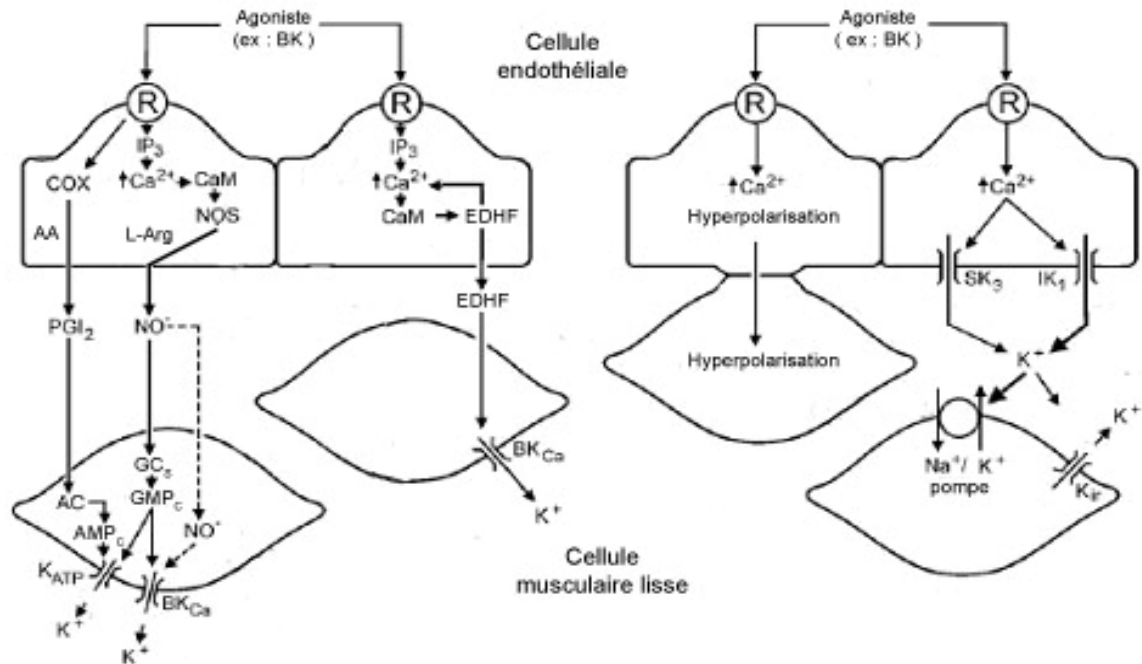
### 1.3.3. Les hormones vasoactives et les facteurs endothéliaux

En plus des barorécepteurs qui régulent les variations brusques de pression artérielle, les hormones empruntant la circulation sanguine peuvent réguler le tonus vasculaire et la pression artérielle. Aussi, plusieurs médiateurs chimiques d'origine endothéliale peuvent agir sur les vaisseaux sanguins. La relâche de médiateurs vasoactifs par l'endothélium (figure 4) est l'un des plus importants systèmes de régulation du diamètre des vaisseaux sanguins. Une mauvaise régulation locale du tonus musculaire artériel relié à l'endothélium (dysfonction endothéliale) favorise le développement de pathologies vasculaires.

---

<sup>1</sup> Ce mémoire est rédigé conformément aux rectifications orthographiques du Conseil supérieur de la langue française (ex. : *maîtrise*, *aout*, *entraîne*, *connait* et *chaîne* sans accent circonflexe, *médullosurrénale* en un seul mot, accent aigu français sur *média*, etc.) [www.nouvelleortographe.info].





**Figure 4: Les médiateurs endothéliaux qui permettent la contraction ou la relaxation des cellules du muscle lisse vasculaire.**

**Abbréviations :** BK : bradykinine; R : récepteur;  $IP_3$  : inositol 1,4,5-triphosphate;  $Ca^{2+}$  : calcium; CaM : calmoduline; NOS : synthase de monoxyde d'azote; L-Arg : L-arginine; NO : monoxyde d'azote; GCs : guanylate cyclase soluble;  $GMP_c$  : guanosine monophosphate cyclique; COX : cyclooxygénase; AA : acide arachidonique;  $PGI_2$  : prostacycline; AC : adénylate cyclase;  $AMP_c$  : adénosine monophosphate cyclique;  $K_{ATP}$  : canal potassique sensible à l'ATP;  $K^+$  : potassium;  $BK_{Ca}$  : canal potassique à grande conductance activé par le calcium; EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium;  $SK_3$  : canal potassique à petite conductance activé par le calcium;  $IK_1$  : canal potassique à rectification entrante;  $Na^+/K^+$  pompe : pompe à sodium et à potassium;  $K_{ir}$  : canal potassique à rectification entrante. [Inspiré de Mombouli et Vanhoutte, 1999; Vanhoutte 2002, 2009]

### 1.3.3.1.L'adrénaline et la noradrénaline

L'adrénaline et la noradrénaline sont des hormones qui sont sécrétées par la médullosurrénale et leurs concentrations sanguines reflètent habituellement l'activité du système nerveux sympathique (Guyton et Hall, 2003). Il existe deux types de récepteurs

adrénergiques : les récepteurs alpha et bêta (Guyton et Hall, 2003). La noradrénaline stimule préférentiellement les récepteurs alpha et à un moindre degré les récepteurs bêta, alors que l'adrénaline stimule les deux types de récepteurs avec une affinité similaire (Guyton et Hall, 2003). Ceci explique pourquoi la noradrénaline est un vasoconstricteur puissant, alors que l'adrénaline l'est moins. Les récepteurs adrénergiques sont divisés en sous-groupes :  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  et  $\beta_2$  (Guyton et Hall, 2003). De manière générale, la stimulation des récepteurs  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  provoque la vasoconstriction et celle des récepteurs  $\beta_2$  provoque la vasodilatation, alors que le récepteur  $\beta_1$  est davantage associé à l'activité cardiaque (Guyton et Hall, 2003). Une tumeur à la médullosurrénale peut provoquer une sécrétion excessive de ces deux hormones, ce qui engendre une augmentation de la contraction cardiaque et une vasoconstriction périphérique généralisée. Cela conduit éventuellement au développement d'une hypertension endocrine (Sherwood, 2004).

### 1.3.3.2. La vasopressine

La vasopressine, aussi appelée l'hormone antidiurétique, est formée dans l'hypothalamus et exerce un effet majeur sur la pression artérielle. Elle favorise le maintien de la balance hydrique par le rein, mais elle agit aussi comme vasoconstricteur sur les vaisseaux sanguins (Guyton et Hall, 2003; Sherwood, 2004). La vasopressine est souvent sollicitée dans des cas d'hémorragie, où il y a une diminution soudaine du volume plasmatique. Les effets de la vasopressine sont relayés par deux récepteurs couplés aux protéines G (*G protein couple receptor*, GPCR) nommés  $V_1$  et  $V_2$ . Le récepteur  $V_1$ , retrouvé principalement sur les cellules musculaires lisses, active la phospholipase C et augmente la concentration intracellulaire de calcium, ce qui augmente la résistance périphérique (Alberts, 2004; Treschan et Peters, 2006). La stimulation des récepteurs  $V_2$ , situés sur les cellules du tubule collecteur, active l'adénylate cyclase et augmente les taux de 3',5'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Sherwood, 2004; Treschan et Peters, 2006). Cette augmentation d'AMPc permet l'incorporation des aquaporines-2 par l'intermédiaire de la protéine kinase A (PKA) (Guyton et Hall, 2003; Sherwood, 2004; Treschan et Peters, 2006). Les aquaporines sont des canaux hydriques initialement présents

dans des vésicules cytoplasmiques qui vont migrer vers la membrane apicale, ce qui permet la réabsorption de l'eau (Guyton et Hall, 2003; Treschan et Peters, 2006). La perte de réponse à la vasopressine par des récepteurs défectueux au niveau du rein engendre une déshydratation sévère (Guyton et Hall, 2003).

#### **1.3.3.3.L'angiotensine II**

L'angiotensine II (Ang II) peut être considérée comme une hormone circulante ou un autacoïde (Guyton et Hall, 2003). Son rôle primaire est le maintien de la balance hydrique et sodique par le rein, mais elle agit aussi sur les vaisseaux sanguins et provoque la vasoconstriction. Elle engendre la résistance périphérique totale de l'organisme et, par conséquent, l'augmentation de la pression artérielle (Guyton et Hall, 2003). La compression d'une artère rénale provoque une augmentation de la rénine qui favorise la voie de la synthèse d'angiotensine II. Ainsi, une réaction de rétention d'eau et de sel créant une élévation du volume sanguin et une vasoconstriction, sous l'action de l'angiotensine II, favorisent le développement de l'hypertension rénale (Guyton et Hall, 2003; Sherwood, 2004). Le rein constitue le principal organe responsable du maintien de la pression artérielle à long terme (Guyton et Hall, 2003).

#### **1.3.3.4.L'endothéline**

L'endothéline (ET) est une hormone vasoactive reconnue comme étant l'un des plus puissants vasoconstricteurs. Elle est majoritairement formée dans les cellules endothéliales et cause la contraction des cellules du muscle lisse vasculaire. L'ET est habituellement relâchée à la suite d'une lésion de l'endothélium ou de l'injection d'un agent létal ou toxique dans la circulation sanguine (Guyton et Hall, 2003). Une anomalie dans le gène codant l'ET menant à une surproduction d'ET engendre une vasoconstriction soutenue et favorise l'hypertension artérielle (Sherwood, 2004).

### **1.3.3.5.Le monoxyde d'azote**

Le monoxyde d'azote (NO) n'est pas une hormone, mais bien un gaz qui peut diffuser à travers les membranes cellulaires. C'est un agent libéré de manière basale par la synthèse de monoxyde d'azote endothéliale (eNOS) des cellules endothéliales et agit sur les CMLV en causant une vasorelaxation (Guyton et Hall, 2003; Wiemer et Wirth, 1992). Le NO favorise la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) par l'intermédiaire de la guanylate cyclase soluble (Vanhoutte, 1989). Le GMPc active la protéine kinase G ce qui favorise la vasodilatation, car cette kinase inhibe la formation de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) responsable de la mobilisation du calcium intracellulaire. Ce calcium ne peut donc pas activer la kinase responsable de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine et la contraction est ainsi empêchée (Tang et al., 2003). De plus, le NO a un effet inhibiteur sur la libération de rénine (et donc de la formation d'Ang II) et d'endothéline (Vanhoutte, 2000; Vidal, Romero, et Vanhoutte, 1988). Une dysfonction endothéliale caractérisée par la diminution du NO réduit la vasodilatation et entraîne une augmentation de la pression artérielle (Sherwood, 2004).

### **1.3.3.6.La bradykinine**

La bradykinine (BK) est un peptide autacoïde qui cause la vasodilatation en libérant du NO produit par les cellules endothéliales vers les CMLV. La BK favorise aussi la perméabilité capillaire. Donc, la BK joue un rôle dans la régulation du débit sanguin et dans la fuite de liquide hors des capillaires, surtout lors de l'inflammation (Guyton et Hall, 2003). En cas de perte d'endothélium, la BK a un effet vasoconstricteur qui est dû à l'activation des récepteurs des kinines sur les CMLV (Leeb-Lundberg, Marceau, Muller-Esterl, Pettibone, et Zuraw, 2005).

### **1.3.3.7.La prostacycline**

La prostacycline (PGI<sub>2</sub>) est un vasodilatateur qui s'oppose aux effets que provoquent le système nerveux sympathique, l'Ang II et l'endothéline (Guyton et Hall,

2003). Dans les CMLV, la prostacycline libérée par l'endothélium favorise la relaxation des CMLV en augmentant la production d'AMPC par l'intermédiaire de l'adénylate cyclase (Vane et Botting, 1995). Cependant, la prostacycline ne joue qu'un rôle mineur dans la relaxation endothélium-dépendant, car son effet ne fait que s'ajouter à celui du NO (Moncada et Vane, 1978) selon les vaisseaux et les espèces.

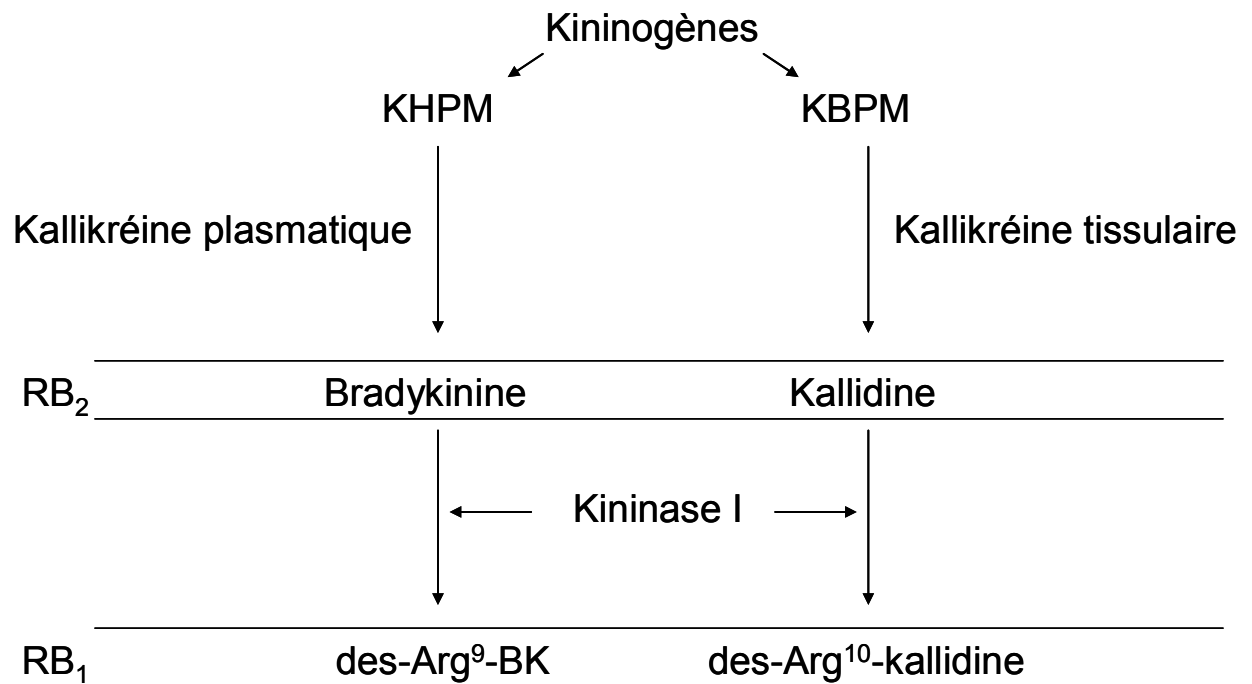
#### **1.3.3.8. Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium**

Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*, EDHF) est un facteur de relaxation libéré par l'endothélium dont la nature chimique n'est pas encore connue. L'EDHF engendre l'augmentation de la concentration d'ions calcium cytosolique dans les cellules endothéliales (Feletou et Vanhoutte, 2007). Cette augmentation favorise l'ouverture des canaux potassiques calcium-dépendant à petite ( $SK_3$ ) et à moyenne conductance de la membrane cellulaire et conduit à l'hyperpolarisation de ces cellules endothéliales (Feletou et Vanhoutte, 2007). Aussi, cet efflux de potassium causé par les cellules endothéliales peut stimuler les canaux potassiques à grande conductance ( $BK_{Ca}$ ) et la pompe à sodium et à potassium ( $Na^+/K^+$  ATPase) des CMLV, causant l'hyperpolarisation de ces dernières (Feletou et Vanhoutte, 2007). L'hyperpolarisation des CMLV peut aussi être créée par l'intermédiaire d'échange par des jonctions myoendothéliales qui joignent les cellules endothéliales hyperpolarisées aux CMLV, qui le deviennent par échange ionique (Feletou et Vanhoutte, 2007).

## **2. Le système kallikréine-kinine**

### **2.1. La formation des kinines**

Le système kallikréine-kinine contribue à plusieurs aspects de l'homéostasie cardiovasculaire et métabolique. Les actions physiologiques de ce système sont produites par deux kinines endogènes : la bradykinine et la kallidine, formées par le clivage protéolytique de kininogènes à haut et à bas poids moléculaire par la kallikréine plasmatique et tissulaire, respectivement. Les kininogènes sont des protéines à multidomaines qui incluent la séquence de la BK (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH) (Marceau, Hess, et Bachvarov, 1998). Les kinines sont des peptides formés localement après un dommage tissulaire ou après un stimulus inflammatoire (Ni, Chao, et Chao, 1998). Donc, les kallikréines sont les enzymes qui clivent les kininogènes et libèrent les kinines (figure 5). Les kinines exercent un large éventail d'effets physiologiques et pathologiques, incluant la contraction des muscles lisses, la vasodilatation de manière endothélium-dépendant, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la modulation du contrôle des fonctions cellulaires et de la mitogenèse, et l'induction de la douleur (Goldstein et Wall, 1984; Hall, 1992; Touyz et Schiffrin, 2000; Vanhoutte, 1989).



**Figure 5: Mécanisme de formation des kinines responsables de l'activation des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines.**

**Abréviations :** KBPM : kininogène à bas poids moléculaire; KHPM : kininogène à haut poids moléculaire; RB<sub>2</sub> : récepteur B<sub>2</sub> des kinines; RB<sub>1</sub> : récepteur B<sub>1</sub> des kinines; des-Arg<sup>9</sup>-BK : des-Arginine<sup>9</sup>-bradykinine, des-Arg<sup>10</sup>-kallidine : des-Arginine<sup>10</sup>-kallidine.

## 2.2. Les récepteurs des kinines

Les récepteurs des kinines sont des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G à la surface cellulaire (Prado et al., 2002). Il existe deux types de récepteurs des kinines : le récepteur B<sub>1</sub> (RB<sub>1</sub>) et le récepteur B<sub>2</sub> (RB<sub>2</sub>) (Regoli et Barabé, 1980). Ces deux récepteurs ont une faible homologie de séquence, qui est de 36 % (McLean, Perretti, et Ahluwalia, 2000).

### **2.2.1. Le récepteur B<sub>2</sub>**

Le RB<sub>2</sub> est constitutivement exprimé dans une variété de tissus et de lignées cellulaires en culture (Bathon et Proud, 1991) et relaye la majorité des actions de la BK. Le RB<sub>2</sub> a pour ligand les kinines intactes, BK et kallidine. La BK a des effets vasodilatateurs (Christopher, Velarde, et Jaffa, 2001) et protecteurs qui sont bien établis (Kintsurashvili et al., 2001), lesquels sont généralement attribués au NO et aux prostaglandines.

### **2.2.2. Le récepteur B<sub>1</sub>**

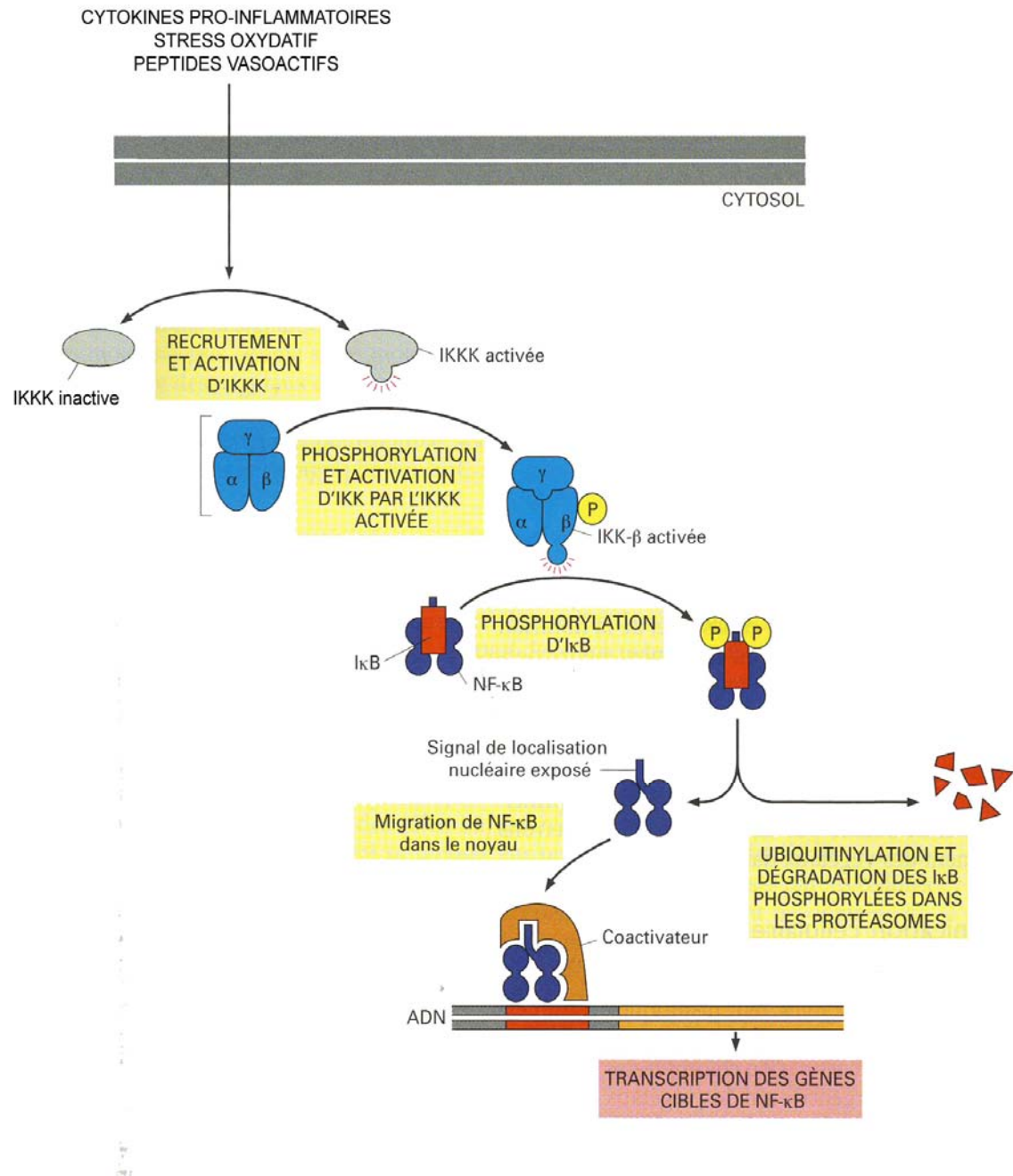
Le RB<sub>1</sub> des kinines n'est pas constitutivement exprimé puisqu'il n'est pas présent en quantité significative dans les tissus normaux; son expression est plutôt induite en présence de cytokines pro-inflammatoires, de facteurs de croissance et du stress oxydatif (Couture et Girolami, 2004). Cette induction peut se faire dans une variété de types cellulaires, incluant les CMLV, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Kintsurashvili et al., 2001; McLean et al., 2000). Le RB<sub>1</sub> a plus d'affinité pour les métabolites carboxypeptidases des kinines (clivées par la kininase I) (Marceau et al., 1998), soit la des-Arg<sup>9</sup>-BK et la des-Arg<sup>10</sup>-kallinine (Marceau, 1995). Le RB<sub>1</sub> est donc habituellement induit dans des situations pathologiques. Un autre facteur qui distingue le RB<sub>1</sub> du RB<sub>2</sub> est qu'une souris invalidée pour le gène du RB<sub>1</sub> ne montre pas de phénotype hyper- ou hypotensif (Pesquero et al., 2000), contrairement à une souris invalidée pour le gène du RB<sub>2</sub>, qui est prédisposée à l'hypertension (Alfie, Sigmon, Pomposiello, et Carretero, 1997; Alfie, Yang, Hess, et Carretero, 1996).

#### **2.2.2.1. Le mécanisme de régulation du récepteur B<sub>1</sub>**

La protéine qui régule l'expression du gène du RB<sub>1</sub> est le facteur de transcription nucléaire kappa B (*Nuclear Factor κB*, NF-κB) (Campos, Souza, et Calixto, 1999; Ni et al., 1998; Schanstra et al., 1999). Cette protéine régulatrice est un facteur de transcription qui est habituellement séquestré sous une forme inactive dans le cytoplasme par l'inhibiteur du NF-κB (IκB). Le NF-κB est activé par divers stimuli extracellulaires comme les cytokines



pro-inflammatoires, le stress oxydatif et les peptides vasoactifs (Alberts, 2004; Mehta et Griendling, 2007; Pueyo et al., 2000) (figure 6). Il existe 5 protéines NF- $\kappa$ B chez les mammifères : RelA, RelB, Rel-c, NF- $\kappa$ B1 et NF- $\kappa$ B2 (Alberts, 2004). Ces protéines forment des dimères (homodimères ou hétérodimères) qui régulent la transcription de plus de 180 gènes (Garg et Aggarwal, 2002). Les I $\kappa$ B sont des protéines inhibitrices qui se fixent au dimère NF- $\kappa$ B et maintiennent celui-ci dans un état inactif dans le cytoplasme. Un stimulus pro-inflammatoire peut déclencher une cascade de signalisation qui mène à la phosphorylation, l'ubiquitinylation et la dégradation au protéasome de l'I $\kappa$ B. Cette dégradation libère et active le NF- $\kappa$ B en exposant son signal de localisation nucléaire. Le NF- $\kappa$ B peut alors migrer dans le noyau et commencer la transcription de gènes spécifiques (Alberts, 2004), comme le RB<sub>1</sub>.

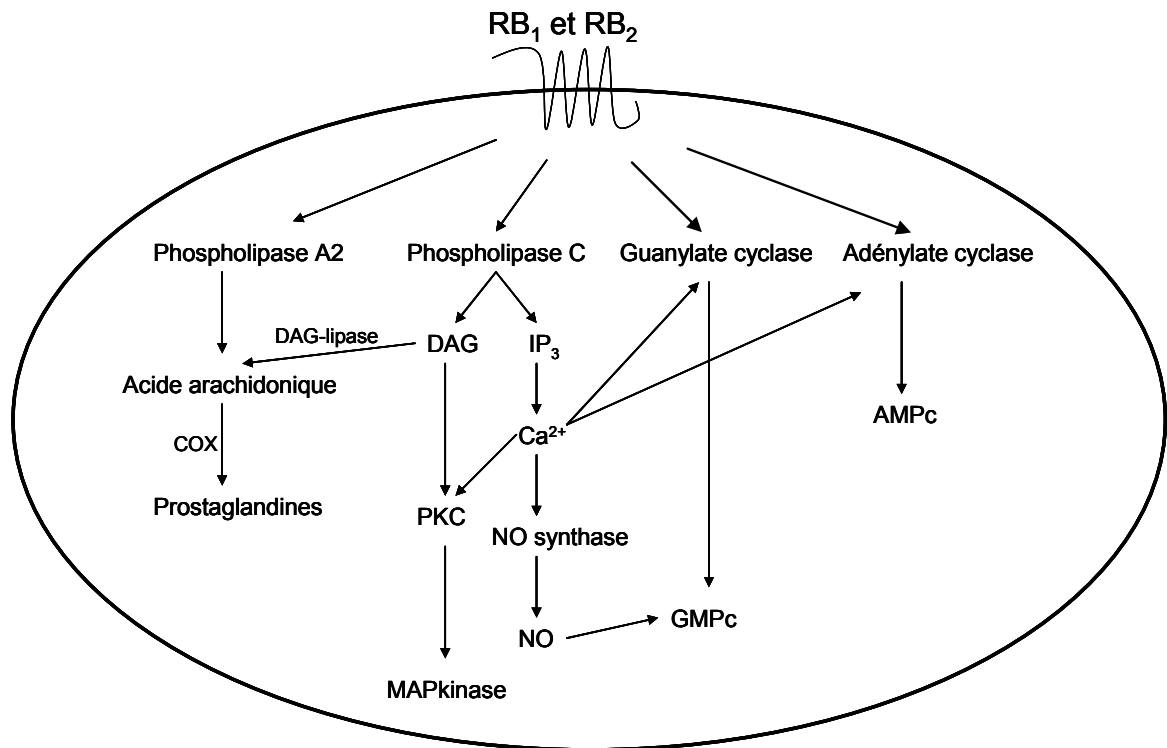


**Figure 6: Mécanisme d'activation du facteur de transcription NF-κB.**

**Abréviations :** IKKK : IκB kinase kinase; IKK : IκB kinase; IKK-β : sous-unité beta de l'IκB kinase; IκB : inhibiteur du NF-κB; NF-κB : facteur de transcription nucléaire kappa B. [Modifié du Alberts, 2004]

### 2.3. Les voies de signalisation des récepteurs des kinines

Une immunoprécipitation de protéines G marquées par photoaffinité a démontré que le RB<sub>1</sub> et le RB<sub>2</sub> sont couplés à G<sub>αq</sub> et à G<sub>αi</sub> (de Weerd et Leeb-Lundberg, 1997; Prado et al., 2002). Sous l'activation, ces récepteurs initient une variété de réponses intracellulaires et intercellulaires qui varient selon les types de cellules et de tissus (figure 7). Ainsi, l'activation d'un récepteur des kinines et de sa protéine G<sub>αq</sub> mène à la formation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et de diacylglycérol (DAG) via la phospholipase Cβ (PLCβ), ce qui permet d'augmenter le niveau de calcium intracellulaire et d'activer la protéine kinase C (PKC) (Gabra, Couture, et Sirois, 2003; Marceau, 1995). De plus, l'activation de ces récepteurs mène à l'inhibition de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de la protéine G<sub>αi</sub>, ce qui inhibe la production d'AMPc. Il peut aussi y avoir une production de messagers seconds impliqués dans la vasodilatation des CMLV (NO, GMPc via la guanylate cyclase, prostaglandine/prostacycline via l'activation de phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)) (McLean et al., 2000; Prado et al., 2002; Wiemer et Wirth, 1992). De plus, il peut y avoir une stimulation de l'activation des protéines-kinases activées par les mitogènes (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK), spécialement ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*), par l'intermédiaire de l'activation des voies de signalisation calcium/calmoduline, Src kinase, PKC, MAPK kinase (*mitogen-activated/extracellular signal regulated kinase*, MEK), ou encore par une production d'espèces réactives oxygénées (ERO) (Christopher et al., 2001; Greene, Velarde, et Jaffa, 2000; Naidu et al., 1999).



**Figure 7: Mécanismes de signalisation des récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines.**

**Abréviations :** COX : cyclooxygénase; DAG : diacylglycérol; PKC : protéine kinase C; IP<sub>3</sub> : inositol 1,4,5-triphosphate; Ca<sup>2+</sup> : calcium; NO : monoxyde d'azote; GMPc : guanosine monophosphate cyclique; AMPc : adénosine monophosphate cyclique. [Inspiré de Gabra, Couture et Sirois, 2003]

Après son activation par un agoniste, le RB<sub>2</sub> subit une désensibilisation et une internalisation rapide (minutes), c'est-à-dire par phosphorylation de sa queue C-terminale (Leeb-Lundberg et al., 2005) et du recrutement d'une  $\beta$ -arrestine 2 (Enquist, Skroder, Whistler, et Leeb-Lundberg, 2007) qui diminue le nombre de RB<sub>2</sub> à la surface cellulaire, un mécanisme habituellement confirmé par une rapide réversibilité des effets biologiques. Ce mécanisme de désensibilisation du RB<sub>2</sub> a été observé dans plusieurs types cellulaires comme les cellules mésangiales (Bascands et al., 1993), les cellules endothéliales (Smith, Webb, Holford, et Burgess, 1995), les CMLV (Mathis, Criscimagna, et Leeb-Lundberg, 1996) et plusieurs autres systèmes qui ont subi un transfection du RB<sub>2</sub> (Blaukat, Alla,

Lohse, et Muller-Esterl, 1996; Blaukat et al., 2001; Fathy, Leeb, Mathis, et Leeb-Lundberg, 1999). À la suite de cette endocytose, le RB<sub>2</sub> est recyclé à la surface de la membrane plasmique (Bachvarov et al., 2001; Leeb-Lundberg et al., 2005).

De son côté, une fois activé, le RB<sub>1</sub> n'est pas désensibilisé (Mathis et al., 1996) et démontre une internalisation lente (heures) et limitée (Fortin, Bouthillier, et Marceau, 2003; Leeb-Lundberg et al., 2005; McLean et al., 2000; Prado et al., 2002). Contrairement au RB<sub>2</sub>, la queue C-terminale du RB<sub>1</sub> ne contient pas de sérine ou de thréonine qui pourrait être phosphorylée pour faciliter son internalisation (Blaukat et al., 1999; Leeb-Lundberg et al., 2005). De plus, Enquist et ses collaborateurs (2007) ont démontré que la stimulation du RB<sub>1</sub> stabilise de manière transitoire le récepteur à la membrane et retarde son internalisation, ce qui n'est pas la régulation traditionnelle des GPCR qui habituellement sont désensibilisés et internalisés après avoir été activés par leur agoniste (Ferguson, 2001; Lefkowitz, Pitcher, Krueger, et Daaka, 1998). Le RB<sub>1</sub> peut s'internaliser de manière constitutive, c'est-à-dire sans qu'il y ait stimulation par son propre agoniste (Enquist et al., 2007; Fortin et al., 2003). Une fois internalisé, le RB<sub>1</sub> n'est pas recyclé, mais il est envoyé directement au lysosome pour être dégradé (Enquist et al., 2007). Bref, ces différences entre les deux récepteurs des kinines suggèrent que, malgré une signalisation semblable, le manque de régulation traditionnelle du RB<sub>1</sub> peut contribuer à l'action pathologique et à l'activité particulière de ce récepteur.

## **2.4. Les actions vasculaires des récepteurs des kinines**

Du point de vue circulatoire, la vasodilatation relayée par les récepteurs des kinines est habituellement un phénomène dépendant de l'endothélium (endothélium-dépendant), comme dans le cas de la circulation chez le rat (McLean, Perretti, et Ahluwalia, 1999), le bovin (Drummond et Cocks, 1995b; Gryglewski, Uracz, Chlopicki, et Marcinkiewicz, 2002), le porc (Pruneau, Luccarini, Defrene, Paquet, et Belichard, 1996) et l'humain (Drummond et Cocks, 1995a; Gryglewski et al., 2002). Une large part de la dépendance à l'endothélium peut être attribuée à la production de NO endothélial (Busse et Fleming,

1995). Ce NO endothélial est produit par l'activation de la eNOS et diffuse vers les CMLV (Wiemer et Wirth, 1992) pour activer la guanylate cyclase soluble et produire du GMPc, causant la vasodilatation. Par contre, lors d'une pathologie où l'endothélium est affecté, les kinines stimulent les récepteurs à la membrane des CMLV et favorisent l'augmentation de calcium intracellulaire, ce qui entraîne la vasoconstriction (endothélium-indépendant) (Leeb-Lundberg et al., 2005). Les mécanismes moléculaires entraînant la contraction sont semblables à ceux de l'Ang II. Le RB<sub>2</sub> suscite une augmentation transitoire du calcium alors que le RB<sub>1</sub> suscite un signal soutenu qui est caractérisé par un plateau de calcium (Leeb-Lundberg et al., 2005). Cette vasoconstriction a suscité beaucoup d'intérêt dans le monde scientifique, particulièrement pour le RB<sub>1</sub>, et a été observée dans une variété de vaisseaux sanguins incluant l'aorte de lapin (Lévesque, Drapeau, Grose, Rioux, et Marceau, 1993; Regoli, Barabé, et Park, 1977), les veines rénales de cochon (Rizzi, Calo, Amadesi, et Regoli, 1997), les artères (Abbas, Clayton, Marshall, et Senior, 1998) et les veines (Gobeil et al., 1996; Sardi, Perez, Antunez, et Rothlin, 1997) ombilicales de l'humain. Donc, la diversité fonctionnelle et mécanique de la réactivité vasculaire relayée par les récepteurs des kinines peut être reliée à l'espèce animale et/ou à la variation de la région et/ou aux différences dans la sensibilité locale aux médiateurs.

## **2.5. Le catabolisme des kinines**

Les kinines sont métabolisées rapidement par un groupe d'enzymes retrouvé dans le sang, les tissus et les liquides biologiques : les kininases. Ces kininases se divisent en deux groupes, soit les aminopeptidases et les carboxypeptidases (Gabra et al., 2003).

### **2.5.1. Les aminopeptidases**

Les aminopeptidases sont des enzymes qui clivent les kinines en position N-terminale (figure 8). On connaît deux types d'aminopeptidases. Premièrement, l'aminopeptidase M clive la Lys en position N-terminale de la kallidine et de la des-Arg<sup>10</sup>-kallidine pour donner la BK et la des-Arg<sup>9</sup>-BK, respectivement (Marceau et al., 1998).

Deuxièmement, l'aminopeptidase P clive l'Arg<sup>1</sup> en position N-terminale en brisant le pont Arg<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> pour donner la BK-(2-9) ou des-Arg<sup>1</sup>-BK (Ryan, Berryer, Chung, et Sheffy, 1994).

## **2.5.2. Les carboxypeptidases**

Les carboxypeptidases sont les enzymes les plus importantes dans la dégradation des kinines. Ce groupe de peptidases clive les kinines en position C-terminale et comprend les kininases I et les kininases II (Marceau et al., 1998) (figure 8).

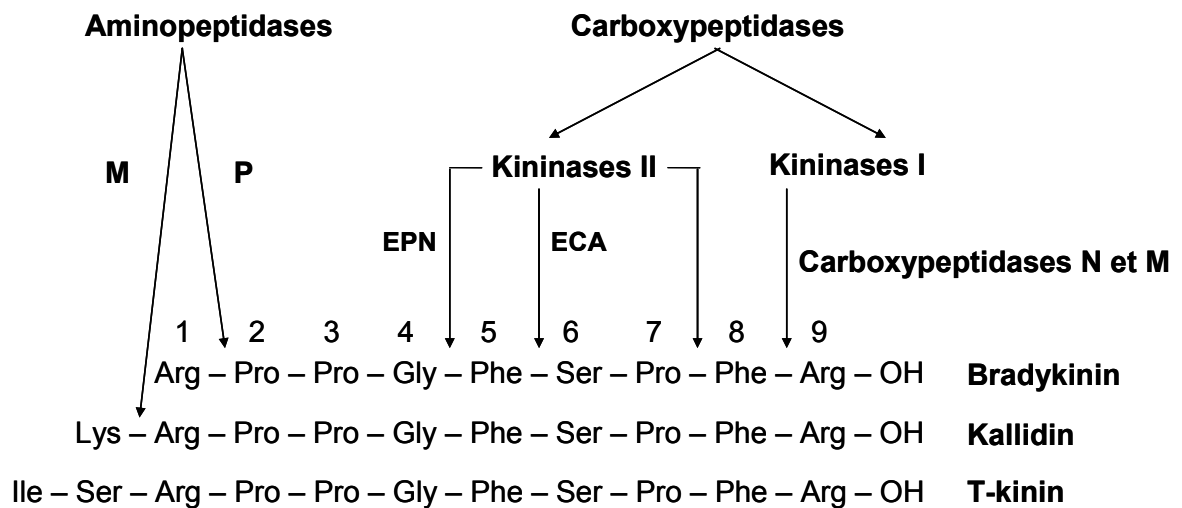
### **2.5.2.1. Les kininases I**

Le groupe des kininases I comprend la carboxypeptidase N du plasma et la carboxypeptidase M de la membrane cellulaire. Les kininases I jouent un faible rôle dans la désactivation des kinines, car elles ne sont responsables que de 10 % du métabolisme des kinines (Décarie, Raymond, Gervais, Couture, et Adam, 1996). Par contre, l'activité des kininases I est particulièrement importante, car elles sont responsables de la génération des métabolites actifs des kinines sans le résidu arginine en position C-terminale (soit la des-Arg<sup>9</sup>-BK à partir de la BK, la des-Arg<sup>10</sup>-kallidine à partir de la kallidine, et la des-Arg<sup>11</sup>-T-kinine à partir de la T-kinine) (Gabra et al., 2003). Dans des conditions normales, le RB<sub>1</sub> est absent et ces métabolites restent fonctionnellement « silencieux », et ce n'est que suivant des situations où le RB<sub>1</sub> est induit que ces métabolites montrent leur activité.

### **2.5.2.2. Les kininases II**

Le groupe des kininases II comprend l'endopeptidase neutre (EPN) et l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA). Les kininases II dégradent la BK (Couture et Girolami, 2004) en enlevant les dipeptides Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup> en position C-terminale, donnant ainsi des fragments biologiquement inactifs, la BK-(1-7) (Gabra et al., 2003). L'EPN peut cliver la BK-(1-7) entre la Gly<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup> pour donner un peptide inactif, la BK-(1-4) (Gabra et al., 2003). L'ECA convertit l'angiotensine I (Ang I) en angiotensine II (Ang II), mais

dégrade également la BK-(1-7) en enlevant le dipeptide Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup> pour donner la BK-(1-5) (Gabra et al., 2003). L'ECA est principalement localisée à la surface membranaire des cellules endothéliales, majoritairement via la circulation pulmonaire et c'est à cet endroit que se fait la plus grande inactivation des kinines en circulation (plus de 75 %) (Marceau et al., 1998). Ainsi, les inhibiteurs de ECA (enalapril et captopril) ne répriment pas seulement la conversion de l'Ang I en Ang II, mais augmentent aussi le niveau de kinines endogènes (Marceau et al., 1998).



**Figure 8: Sites d'actions des enzymes catalytiques des kinines.**

**Abréviations :** EPN : endopeptidase neutre; ECA: enzyme de conversion de l'angiotensine I. [Gabra, Couture et Sirois, 2003]

### 3. Les vaso-peptides

#### 3.1. L'angiotensine II

L'angiotensine II (Ang II), une hormone octapeptidique, est le principal effecteur du système rénine-angiotensine. L'Ang II est produite de manière systémique et locale dans



les vaisseaux sanguins (Higashimori, Gante, Holzemann, et Inagami, 1991) par l'action de la rénine qui convertit l'angiotensinogène en angiotensine I, et l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) clive l'angiotensine I pour former l'angiotensine II (Guyton et Hall, 2003).

### **3.1.1. Les récepteurs de l'angiotensine II**

L'effet cellulaire de l'Ang II est relayé par au moins deux types de récepteurs de hautes affinités, soit AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, appartenant à la superfamille des GPCR à sept passages transmembranaires (Mukoyama et al., 1993; Murphy, Alexander, Griendling, Runge, et Bernstein, 1991). Le récepteur AT<sub>1</sub> relaye la majorité des actions physiologiques de l'Ang II et est exprimé normalement dans les tissus adultes. Dans les CMLV, c'est le récepteur AT<sub>1</sub> qui est principalement exprimé, alors que le récepteur AT<sub>2</sub> est majoritairement exprimé dans l'adventitia et est presque indétectable dans les CMLV (Zhou, Polgar, et Taylor, 1998). Le récepteur AT<sub>2</sub> est normalement exprimé à un haut niveau dans les tissus fœtaux et décroît rapidement après la naissance, mais il y en demeure une petite quantité dans certains tissus adultes (Siragy et Carey, 1996; Zhou et al., 1998).

### **3.1.2. Les voies de signalisation du récepteur AT<sub>1</sub>**

La stimulation des CMLV avec l'Ang II active le récepteur AT<sub>1</sub> qui est couplé à G<sub>αq</sub> et à G<sub>αi</sub>, ce qui mène à l'activation de la phospholipase C (PLC) (Griendling et al., 1986), à la mobilisation du calcium intracellulaire (Brock, Alexander, Ekstein, Atkinson, et Gimbrone, 1985), à une activation de la PKC (Griendling, Tsuda, Berk, et Alexander, 1989), à une inhibition de l'activité adénylate cyclase (Anand-Srivastava, 1983), à une activation des voies de signalisation des MAPK (Touyz et Schiffrin, 2000), à une production d'ERO (Laplane et de Champlain, 2006) et à la phosphorylation de protéines tyrosines kinases telles que : c-Src, les kinases de la famille janus (*janus family kinases*, JAK), les kinases d'adhésion focale (FAK), la tyrosine kinase riche en proline (proline-rich tyrosine kinase 2, Pyk2), p130Cas et la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Eguchi et

Inagami, 2000; Mehta et Griendling, 2007; Molloy, Taylor, et Weber, 1993; Touyz, He, Deng, et Schiffrin, 1999) (Figure 9). Un des régulateurs importants pour plusieurs de ces cibles est c-Src. Lorsque c-Src est activé par l'Ang II, il régule l'activité de la MAPK, de la PLC $\gamma$ , de la Pyk2, des FAK, des JAK, de la PI3K et de la nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) oxydase (NAD(P)H oxydase) (Touyz, 2005). De plus, l'Ang II peut induire la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance, comme le récepteur de facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor receptor, EGF-R) et récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor receptor, PDGF-R), par l'activation de c-Src et par le stress oxydatif. Cette transactivation permet à l'Ang II d'avoir une plus grande panoplie d'effets signalétiques au niveau cellulaire (Saito et Berk, 2001).

Tous ces messagers seconds activés par le récepteur AT<sub>1</sub> sont impliqués dans les complications vasculaires associées à l'Ang II, la vasoconstriction, le trafic membranaire, la prolifération cellulaire, la réorganisation du cytosquelette, l'hypertrophie et l'hyperplasie (Geisterfer, Peach, et Owens, 1988; Hefti, Harder, Eppenberger, et Schaub, 1997; Itoh, Mukoyama, Pratt, Gibbons, et Dzau, 1993; Touyz, 2005; Touyz et Schiffrin, 2000; Weber, Taylor, et Molloy, 1994). De plus, il a été démontré que l'Ang II active des facteurs de transcription, comme le NF- $\kappa$ B, et induit la phosphorylation des protéines se liant à l'élément de réponse de liaison à l'AMPc nécessaire à la transcription de certains gènes (Funakoshi et al., 2002; Tham et al., 2002).

### **3.1.2.1. La voie de l'IP<sub>3</sub> et du DAG**

La liaison de l'Ang II à son récepteur AT<sub>1</sub> couplé à une protéine Gq stimule la PLC $\beta$  à hydrolyser le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) à la membrane en deux messagers secondaires : l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) soluble et le diacylglycérol (DAG) hydrophobique, qui reste à la membrane (Alexander, Brock, Gimbrone, et Rittenhouse, 1985; Griendling et al., 1986; Rhee, 2001). L'IP<sub>3</sub> relâché dans le cytoplasme stimule la mobilisation du calcium des réserves intracellulaires en se fixant sur les canaux

calciques du réticulum sarcoplasmique, ce qui fait augmenter le niveau de calcium intracellulaire libre (Bouallegue, Daou, et Srivastava, 2007a). Le DAG et le calcium activent ensemble la famille des PKC conventionnelles (Bouallegue et al., 2007a; Salamanca et Khalil, 2005), qui peut phosphoryler les canaux calciques de type TRPC et favoriser la vasoconstriction des CMLV (Large, 2002; Maturana et al., 1999; Saleh, Albert, Peppiatt, et Large, 2006; Touyz et Schiffrin, 2000).

### 3.1.2.2. Les voies des MAPK

Une autre voie de transduction stimulée par l'Ang II est la voie des protéines-kinases activées par les mitogènes (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK). La superfamille des MAPK comprend plusieurs familles dont les trois plus étudiées sont la voie de ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated kinase 1/2*) (isoformes p42 et p44, respectivement), de p38 et de JNK/SAPK (*c-Jun-NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase*) (Chang et Karin, 2001). ERK1/2 est phosphorylé par MEK1/2 et cette voie promeut la croissance et la prolifération (Cano et Mahadevan, 1995), alors que la voie de p38 et celle de JNK/SAPK, phosphorylées respectivement par MEK3/6 et MEK4/7, contrôlent l'inflammation, la survie et la différenciation cellulaire (Cohen, 1997; Kyriakis et Avruch, 1996; Seger et Krebs, 1995). Les MAPK sont des protéines sérine/thréonine kinases qui sont activées par une foule de stimuli extérieurs, comme les facteurs de croissance, les hormones, les cytokines et différents stress cellulaires (Blanc, Pandey, et Srivastava, 2003; Kyriakis et Avruch, 1996; Seger et Krebs, 1995; Srivastava, 2002). Il est connu que ERK1/2 peut être activé par le stress oxydatif, les hormones comme l'Ang II (Wetzker et Bohmer, 2003) et des oxydants comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Guyton, Liu, Gorospe, Xu, et Holbrook, 1996). Les substrats des MAPK incluent les protéines nucléaires et cytosoliques impliquées dans l'initiation de la synthèse d'acide désoxyribonucléique (ADN) et protéique (Duff et al., 1995).

Le mécanisme par lequel l'Ang II peut activer la voie des MAPK n'est pas très bien connu, car le récepteur AT<sub>1</sub>, lié aux protéines G, est dépourvu d'activité tyrosine kinase qui

pourrait activer la cascade des MAPK, où Raf kinase phosphoryle et active MEK, qui, à son tour, phosphoryle et active ERK1/2 (Ishida, Kawahara, Tsuda, Koide, et Yokoyama, 1992; Macdonald et al., 1993). Par contre, la sous-unité  $\beta\gamma$  de la protéine G couplée au récepteur  $AT_1$  via son domaine d'homologie-pleckstrine peut aller activer le complexe Grb2/Sos (formé de la protéine de liaison de facteurs de croissances 2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*, Grb2) et du Sos (*Son of sevenless*)) (Li et al., 1993). Grb2/Sos va stimuler l'échange d'une guanosine diphosphate (GDP) pour une guanosine triphosphate (GTP) sur p21ras et ce dernier sera activé. Le p21ras actif initie la cascade des MAPK en recrutant et en activant Raf kinase, aussi connue sous le nom de MAPK kinase kinase (MAPKKK) (McCormick, 1994; Moodie, Willumsen, Weber, et Wolfman, 1993; Touyz et Schiffrin, 2000). Raf kinase phosphoryle MEK (appelé aussi MAPKK) au niveau des résidus sérine/thréonine, qui, à son tour, va phosphoryler ERK1/2 sur des résidus thréonine et tyrosine (Haystead, Dent, Wu, Haystead, et Sturgill, 1992). De plus, il est possible que la sous-unité  $\beta\gamma$  via la transactivation d'un récepteur tyrosine kinase va phosphoryler la protéine de liaison Shc qui, ensuite, interagirait avec le complexe Grb2/Sos pour enfin activer la cascade des MAPK (Duff et al., 1995).

### 3.1.2.3. La voie de la PI3K

Les phosphatidylinositol 3 kinases (PI3K) sont de la famille des protéines et des lipides kinases. Il existe 3 classes de PI3K. La classe I est exprimée de manière ubiquitaire et représente la forme dominante dans le système vasculaire (Oudit et al., 2004). Cette famille est activée par les récepteurs tyrosine kinase et les GPCR (Oudit et al., 2004). La famille des PI3K de classe I est formée de protéines hétérodimériques comprenant une sous-unité catalytique (p110 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  ou  $\gamma$ ) et une sous-unité régulatrice (p85  $\alpha$  ou  $\beta$ , p55  $\gamma$  ou p101) (Oudit et al., 2004). La PI3K catalyse le transfert d'un phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) aux phosphoinositides. Ces phospholipides agissent comme des messagers seconds et activent des protéines kinases comme la protéine kinase B (PKB)/Akt et la protéine ribosomale S6 kinase de 70 kDa (p70<sup>S6K</sup>) (Rameh et Cantley, 1999). La signalisation par la PI3K est importante puisque l'absence de P110 $\gamma$  protège les souris

contre la contraction des CMLV et la réponse pressive induite par l'Ang II (Vecchione et al., 2005).

**Abréviations :** ANG II : angiotensine II; AT<sub>1</sub>R : récepteur AT<sub>1</sub>; PLD : phospholipase D; PC : phosphatidylcholine; PA : acide phosphatidique; PIP<sub>2</sub> : phosphatidylinositol biphosphate; PLC : phospholipase C; DAG : diacylglycérol; PKC : protéine kinase C; IP<sub>3</sub> : inositol 1,4,5-triphosphate; Ca<sup>2+</sup> : calcium; CaM : calmoduline; PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>; AA : acide arachidonique; COX : cyclooxygénase; PG : prostaglandines; TxA<sub>2</sub> : thromboxane A<sub>2</sub>; ERO : espèces réactives oxygénées; PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase; JAK : kinase de la famille janus ; EGPR : récepteur de facteur de croissance épidermique; JNK : kinase N-terminale c-jun; PDK1 : kinase dépendante des phosphoinositides-1. [Modifié de Mehta et Griendling, 2007]

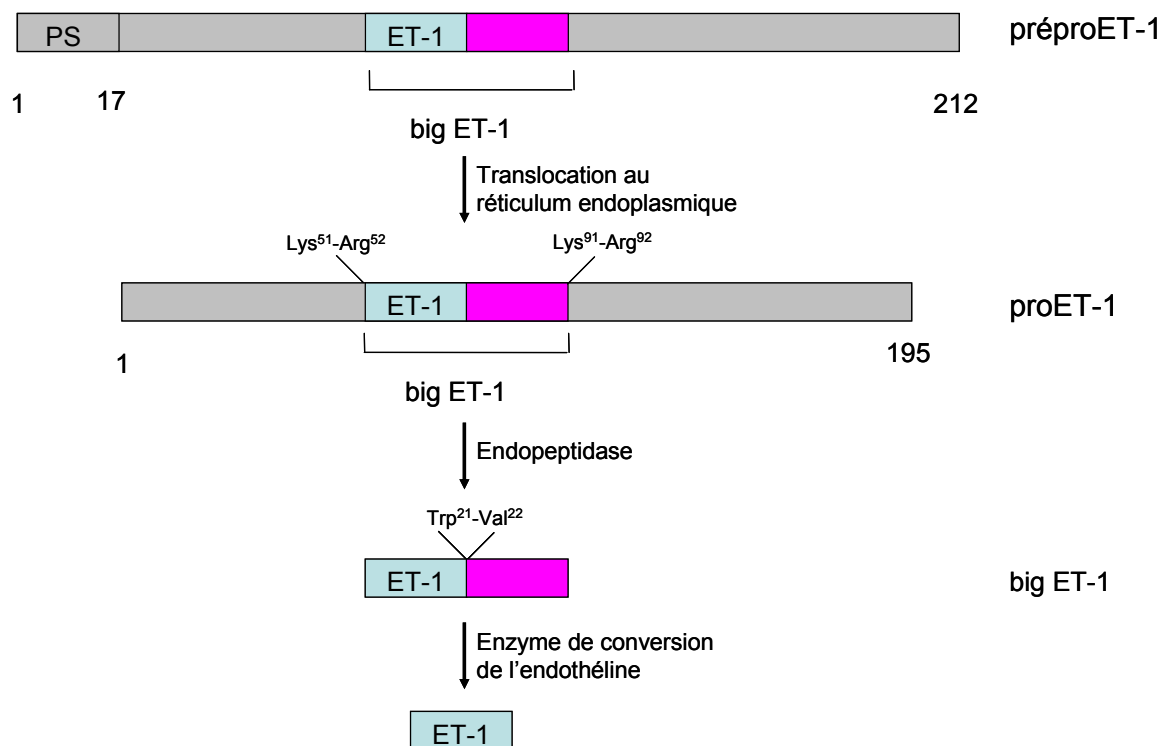
## 3.2. L'endothéline

L'endothéline (ET) est un puissant vasoconstricteur qui influence aussi l'homéostasie de la balance hydrique et sodique en plus de stimuler le système rénine-angiotensine-aldostérone et le système nerveux sympathique (Rabelink et al., 1994; Schiffrin, 1995). L'endothéline est un peptide de 21 acides aminés présent sous 3 isoformes : ET-1, ET-2 et ET-3 (Inoue et al., 1989). ET-2 partage 90 % d'homologie de séquence avec l'ET-1, alors que l'ET-3 partage 71 % d'homologie de séquence avec l'ET-1 et l'ET-2 (Bouallegue et al., 2007a). L'ET-1 est majoritairement produite par les cellules endothéliales (Pinet, 2004). Par contre, d'autres types cellulaires tels que les CMLV et les cardiomyocytes peuvent aussi produire ce peptide (Hahn et al., 1990). Les CMLV aortiques humaines expriment l'acide ribonucléique messenger (ARNm) de l'ET-1, mais sa production est 100 fois plus petite que celle des cellules endothéliales (Bouallegue et al., 2007a). L'ET-1 est une hormone qui, en condition physiologique normale, est non circulante. Elle agit de manière autocrine ou paracrine à plusieurs sites dans l'organisme (Benatti, Fabbrini, et Patrono, 1994; Kedzierski et Yanagisawa, 2001). En plus d'être produite par les cellules endothéliales et les CMLV, l'ET-1 peut aussi être produite par les cellules épithéliales pulmonaires, les macrophages, les fibroblastes, les cardiomyocytes et les neurones (Kedzierski et Yanagisawa, 2001; Lee, de la Monte, Ng, Bloch, et Quertermous, 1990; Rubanyi et Botelho, 1991; Sakai et al., 1996).

### 3.2.1. La synthèse de l'endothéline-1

Il existe peu d'information sur les différentes étapes de la maturation et de la sécrétion de l'ET. Par contre, la voie de biosynthèse proposée la plus connue est celle de l'endothéline-1 (ET-1) et elle est semblable à celle retrouvée pour les facteurs de croissance et les hormones peptidiques (Yanagisawa et al., 1988). La synthèse d'ET-1 débute à partir d'un long précurseur composé de 212 acides aminés, la préproendothéline-1 (Yanagisawa et al., 1988). La préproendothéline-1 subit un premier clivage des 17 premiers acides aminés en N-terminale, ce qui donne la proendothéline-1 (Benatti et al., 1994). Par la suite, cette proendothéline-1 subit un clivage protéolytique à ses deux extrémités, N-terminale et

C-terminale, aux positions Lys<sup>51</sup>-Arg<sup>52</sup> et Lys<sup>91</sup>-Arg<sup>92</sup> par une endopeptidase spécifique pour produire un intermédiaire de 38 acides aminés, le big ET-1. Le big ET-1 est par la suite clivé à la position Trp<sup>21</sup>-Val<sup>22</sup> par une autre endopeptidase, l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) pour former l'ET-1 qui, elle, est biologiquement active (Benatti et al., 1994; Goto, Hama, et Kasuya, 1996) (figure 10).



**Figure 10: Synthèse de l'endothéline-1.**

**Abréviations** : PS : peptide signal, ET-1 : endothéline-1. [Inspiré de Benatti, Fabbri et Patrono, 1994]

La synthèse de l'ET-1 peut être provoquée par plusieurs stimuli tels les hormones vasoactives (Ang II et vasopressine), les facteurs de croissance, la thrombine, les forces de cisaillement (*shear stress*) et le stress oxydatif (Benatti et al., 1994; Goto et al., 1996; Hong



et al., 2004). Li et ses collaborateurs (2003) ont démontré qu'un antagoniste du récepteur  $ET_A$  de l'ET-1 inhibe l'hypertension induite par une infusion d'Ang II. Ainsi, ils ont démontré que les effets de l'Ang II sont relayés, en partie, par la production d'ET-1 (Li et al., 2003). Dans des CMLV aortiques de rat, l'Ang II stimule la synthèse (par la voie de Ras-Raf-ERK) (Hong et al., 2004) et la relâche de l'ET-1 après 6 heures de stimulation à l'Ang II ( $10^{-6}$  M) (Laplanche, Wu, Moreau, et de Champlain, 2005). De plus, un des moyens connus à l'Ang II pour permettre l'expression du gène de l'ET-1 est la génération d'ERO dans les CMLV (Hong et al., 2004). En revanche, il a été démontré que le NO, la prostacycline et le peptide natriurétique auriculaire inhibent la production d'ET-1 (Benatti et al., 1994; Goto et al., 1996).

### **3.2.2. Les récepteurs de l'endothéline**

Les effets de l'ET-1 sont semblables à ceux produits par l'Ang II, comme la vasoconstriction, la prolifération cellulaire et la production de radicaux libres (Benatti et al., 1994; Gorlach, Benyo, et Wahl, 1998; Laplanche et al., 2005; Robin, Boulven, Desmyter, Harbon, et Leiber, 2002; Rosen, Barg, et Zimlichman, 1999). Ces effets se font par l'intermédiaire de deux récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G :  $ET_A$  et  $ET_B$  (Pinet, 2004). Ces deux récepteurs ont 59 % d'homologie et ont des effets différents selon le type cellulaire dans lequel ils sont exprimés (Pinet, 2004).

#### **3.2.2.1. Le récepteur $ET_A$**

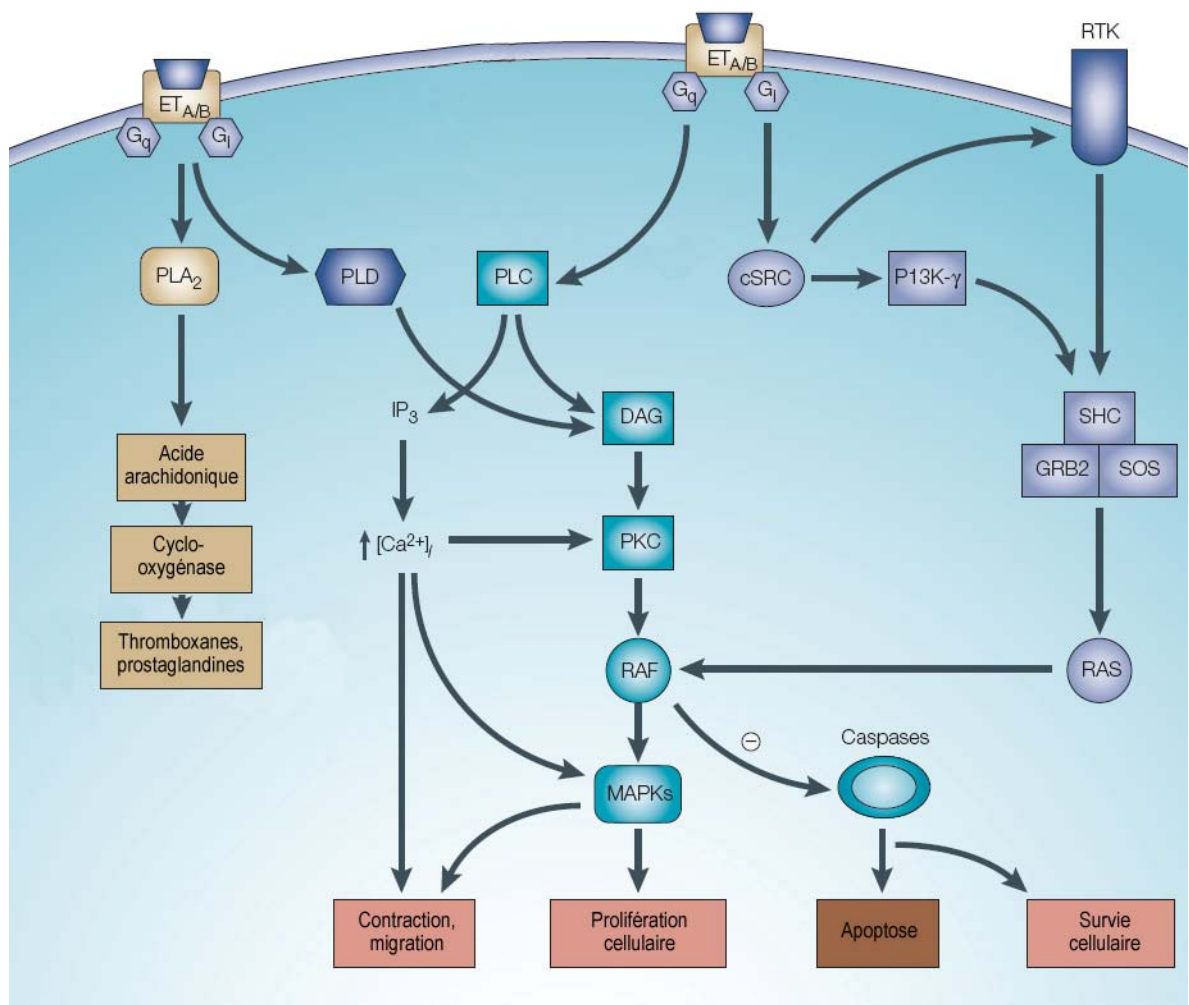
Le récepteur  $ET_A$  est majoritairement exprimé dans les CMLV et relaye la vasoconstriction, la croissance cellulaire et l'adhésion cellulaire (Remuzzi, Perico, et Benigni, 2002). Il est aussi retrouvé dans les cardiomyocytes, les fibroblastes, les hépatocytes, les adipocytes, les ostéoblastes et les neurones du cerveau (Arai, Hori, Aramori, Ohkubo, et Nakanishi, 1990; Endoh et al., 1998). Le récepteur  $ET_A$  a une plus grande affinité pour l'ET-1 et l'ET-2 comparativement à l'ET-3 (Arai et al., 1990).

### **3.2.2.2. Le récepteur ET<sub>B</sub>**

Au niveau du vaisseau sanguin, le récepteur ET<sub>B</sub> est majoritairement exprimé dans les cellules endothéliales et il produit la vasodilatation par la production de NO et de la prostacycline (Hirata et al., 1993; Remuzzi et al., 2002; Rich et McLaughlin, 2003). Par contre, le récepteur ET<sub>B</sub> peut aussi relayer la contraction et la croissance des vaisseaux puisqu'il est aussi exprimé sur les CMLV (Remuzzi et al., 2002). Le récepteur ET<sub>B</sub> est aussi présent sur les cardiomyocytes, les hépatocytes, les fibroblastes, les ostéoblastes et les neurones. Il a une affinité équivalente pour les trois types d'endothéline (Sakurai et al., 1990). En plus de son action vasoactive, le récepteur ET<sub>B</sub> est important pour la régulation de la clairance de l'ET-1 (Rich et McLaughlin, 2003).

### **3.2.3. Les voies de signalisation de l'endothéline-1**

Les mécanismes de signalisation utilisés par l'ET-1 sont très similaires à ceux utilisés par l'Ang II dans les CMLV (Weber, Webb et al., 1994), soit la synthèse d'ADN, l'augmentation du calcium intracellulaire, ainsi que la voie des phosphoinositides et de la PKC (Gorlach et al., 1998; Rosen et al., 1999). Aussi, l'ET-1 peut activer ERK1/2 et, dans un moindre degré, p38 et JNK dans les CMLV (Bouallegue et al., 2007a). De plus, l'ET-1 peut aussi activer la NAD(P)H oxydase et produire l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Laplane et al., 2005). L'ET-1 peut augmenter l'activation de la PKB dans les cardiomyocytes (Pham, Cole, et Clerk, 2001), les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (Dong et al., 2005) et dans les CMLV A10 (Bouallegue, Daou, et Srivastava, 2007b) (figure 11).



**Figure 11: Voies de signalisation de l'endothéline-1.**

**Abréviations :** ET<sub>A/B</sub> : récepteur ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> de l'endothéline; PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>; PLD : phospholipase D; PLC : phospholipase C; DAG : diacylglycérol; PKC : protéine kinase C; IP<sub>3</sub> : inositol 1,4,5-triphosphate; Ca<sup>2+</sup> : calcium; PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase; RTK : récepteur tyrosine kinase. [Modifié de Remuzzi, Perico et Benigni, 2002]

### 3.3. Lien entre les vasozeptides et le récepteur B<sub>1</sub> des kinines

Le système kallikréine-kinine et le système rénine-angiotensine sont impliqués dans le contrôle de la pression sanguine et des fonctions rénales. Même si le rôle principal de ces deux systèmes est opposé dans des conditions physiologiques normales, ils interagissent dans des conditions pathologiques, telles les maladies rénales ou cardiovasculaires qui entraînent une dysfonction endothéliale, une altération de la contractilité et un remodelage vasculaire (Hutchison, Webster, et Jaffa, 1993; Jaffa, Chai, Chao, Chao, et Mayfield, 1992; Jaffa, Vio, Velarde, LeRoith, et Mayfield, 1997; Schmaier, 2003). Bref, autant en conditions physiologiques que pathologiques, les deux systèmes peuvent interagir et s'influencer mutuellement de plusieurs manières. Enfin, le lien qui unit ces deux systèmes est évidemment l'enzyme de conversion de l'angiotensine I.

Peu d'études ont été réalisées sur l'effet de l'Ang II ou de l'ET-1 sur les récepteurs des kinines. Il est connu que l'Ang II exogène augmente l'expression du RB<sub>1</sub> dans les CMLV de rat par l'intermédiaire du récepteur AT<sub>1</sub> (Kintsurashvili et al., 2001). Dans le modèle de rat hypertendu *one-kidney-one-clip* (1K-1C), l'Ang II endogène augmente l'ARNm du RB<sub>1</sub> dans le coeur via le récepteur AT<sub>1</sub> en plus d'augmenter l'expression protéique du RB<sub>1</sub> dans l'endothélium et les cardiomyocytes (Fernandes et al., 2006). Une infusion chronique d'Ang II induit l'expression d'un RB<sub>1</sub> fonctionnel dans l'aorte de rat Wistar impliquant l'anion superoxyde formé par la NAD(P)H oxydase et l'activation du facteur de transcription nucléaire kappa B (Ceravolo et al., 2007). De plus, des inhibiteurs de l'ECA peuvent moduler l'expression des récepteurs des kinines (Ongali et al., 2003). Des études ont indiqué que les inhibiteurs de l'ECA, en plus de bloquer la dégradation métabolique de BK, peuvent activer directement le RB<sub>1</sub> (Ignjatovic, Tan, Brovkovich, Skidgel, et Erdos, 2002; Skidgel, Stanisavljevic, et Erdos, 2006). Dans les cellules endothéliales, les inhibiteurs de l'ECA augmentent l'expression du RB<sub>1</sub> et ceux-ci peuvent interagir et former un hétérodimère pour favoriser l'activation des voies de transduction du signal (Tom, Dendorfer, et Danser, 2003). Dans un modèle de rat hypertendu induit par

l'Ang II, il a été démontré que l'expression du  $RB_1$  est augmentée dans la moelle épinière en association avec la surproduction de l'anion superoxyde vasculaire (Petcu, Ongali, El Midaoui, de Champlain, et Couture, 2005).

D'autre part, l'ET-1 contribue au développement de l'hypertension artérielle en diminuant la réponse à la BK par un mécanisme sensible aux inhibiteurs de l'ECA, mais qui n'implique par le récepteur  $AT_1$  (Tanus-Santos, Gordo, Francisco-DoPrado, Sampaio, et Moreno, 2000). Ainsi, les inhibiteurs de l'ECA atténuent l'hypertension induite par l'ET-1 en augmentant la longévité des kinines et l'activation du  $RB_2$  (Elmarakby, Morsing, et Pollock, 2003). Finalement, alors que le  $RB_2$  inhibe la sécrétion d'ET-1, le  $RB_1$  stimule la sécrétion d'ET-1 par les cellules endothéliales (Momose, Fukuo, Morimoto, et Ogihara, 1993).

## 4. Le stress oxydatif

Les espèces réactives oxygénées (ERO) sont des dérivés de l'oxygène. Ces molécules sont produites à la suite d'un métabolisme aérobie cellulaire et possèdent des propriétés oxydantes (Lyle et Griendling, 2006). L'oxydation d'une molécule se définit comme étant la perte d'électrons par cette molécule, qui la rend instable et réactive (Alberts, 2004). À l'opposé, la réduction se définit comme étant le gain d'électrons par une molécule (Alberts, 2004). Au cours de l'évolution, les espèces vivantes (animaux, plantes et bactéries) se sont adaptées à l'oxygène en développant des enzymes permettant sa consommation, ainsi que l'élimination de ses métabolites réduits. Une surproduction d'ERO ou une déficience dans le processus d'élimination des ERO peut favoriser le développement de complications au plan vasculaire et autres (Bonnefont-Rousselot, 2002; Lassègue et Griendling, 2004; Migliore et Coppede, 2002; Steinberg, Parthasarathy, Carew, Khoo, et Witztum, 1989). Ainsi, le stress oxydatif se produit lorsqu'il y a une surproduction d'ERO par rapport à leur élimination (Lyle et Griendling, 2006).

## 4.1. Les fonctions des espèces réactives oxygénées

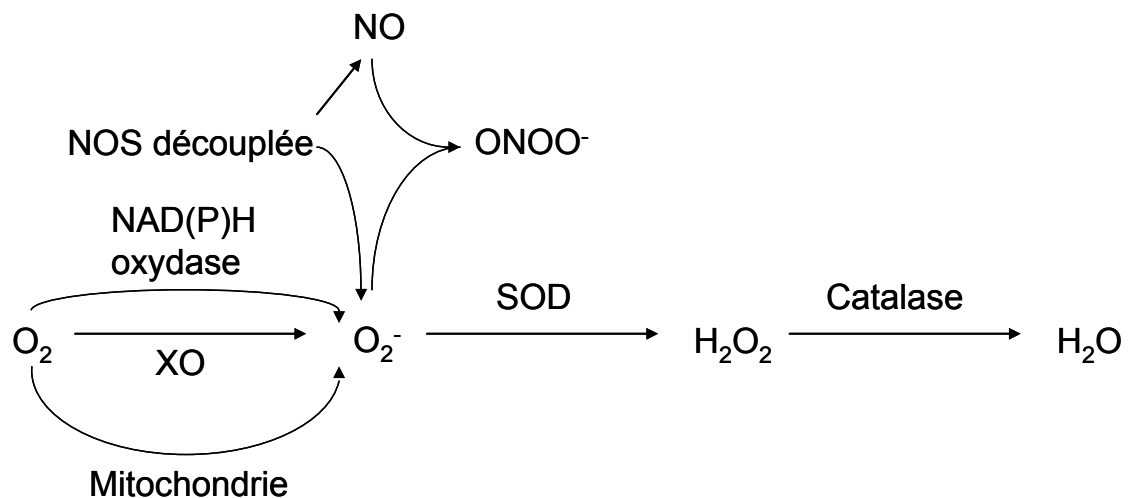
Les espèces réactives oxygénées (ERO) sont considérées comme des messagers seconds qui affectent la signalisation intracellulaire dans plusieurs systèmes, incluant le système cardiovasculaire (Finkel, 1999). Dans des conditions physiologiques, les ERO en excès sont détruites naturellement par des enzymes antioxydantes endogènes, ce qui permet de contrôler leur cascade de signalisation. Par contre, dans des cas de pathologies vasculaires, la production d'ERO n'est pas éliminée par la défense antioxydante endogène (situation de stress oxydatif), ce qui résulte en des réponses physiologiques anormales (Lyle et Griending, 2006). Ainsi, les ERO jouent un rôle de messagers seconds dans les mécanismes de signalisation cellulaire et peuvent avoir des effets graves sur les matériaux biologiques (ADN, protéines, lipides...) en changeant leur activité ou leur fonction principale (Cadet et al., 1999; Laplante et de Champlain, 2006). Ainsi, les ERO sont impliquées dans le phénomène d'apoptose, la prolifération des CMLV, l'hypertrophie, la migration cellulaire, l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et l'agrégation plaquettaire (Taniyama et Griending, 2003).

L'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sont les ERO les plus connues pour avoir un rôle physiologique important dans la signalisation cellulaire (Lyle et Griending, 2006). Par exemple, de récentes études ont montré que le  $H_2O_2$  exogène peut stimuler la cascade de ERK1/2 dans plusieurs types cellulaires (Ceolotto et al., 2006). De plus, l' $O_2^-$  est capable de modifier l'activité enzymatique de tyrosine kinases et de sérine/thréonine kinases, engendrant l'activation des facteurs de croissance qui initient l'expression de gènes dits « rédox-sensibles » comme le NF- $\kappa$ B (Taniyama et Griending, 2003). L'anion superoxyde est potentiellement dangereux sur le plan biologique s'il interagit avec le monoxyde d'azote pour donner des anions peroxynitrites (Moncada, Palmer, et Higgs, 1991). Le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) est une ERO formée grâce à la combinaison d'un anion superoxyde et d'un monoxyde d'azote (Lassègue et Griending, 2004). La formation de peroxynitrites diminue la quantité de NO présent au niveau vasculaire, ce qui diminue la possibilité de dilatation des CMLV. Cela favorise

l'augmentation du tonus vasculaire et la dysfonction endothéliale (Lassègue et Griendling, 2004).

## 4.2. Les sources vasculaires de production des espèces réactives oxygénées

L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont produits par tous les types cellulaires de la paroi vasculaire (Griendling, Sorescu, et Ushio-Fukai, 2000). Les CMLV contiennent de nombreuses sources d'ERO, incluant la NAD(P)H oxydase, la xanthine oxydase, la chaîne respiratoire des mitochondries et les synthases du monoxyde d'azote (*nitric oxide synthase*, NOS) découplées (Tsutsui, 2004) (figure 12). Bien que toutes ces enzymes contribuent au stress oxydatif, plusieurs évidences démontrent qu'une génération initiale d'ERO par la NAD(P)H oxydase déclenche la production des ERO par les autres enzymes (Landmesser et al., 2003).

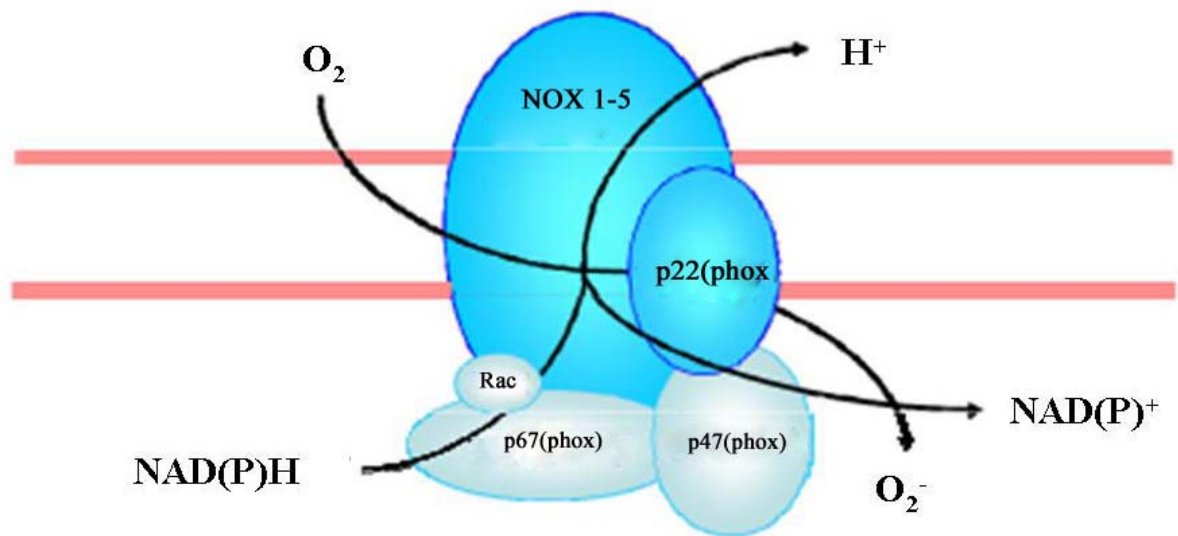


**Figure 12: Voies de production et d'éliminations des espèces réactives oxygénées.**

**Abréviations :** O<sub>2</sub>: oxygène; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anion superoxyde; NOS: synthase du monoxyde d'azote; XO: xanthine oxydase; NO: monoxyde d'azote; ONOO<sup>-</sup>: peroxyde nitrite; SOD : superoxyde dismutase; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène; H<sub>2</sub>O : eau.

### 4.2.1. La NAD(P)H oxydase

La NAD(P)H oxydase est un complexe enzymatique capable de produire la majorité de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) et tous les radicaux libres dérivés à partir de la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Laplane et de Champlain, 2006). La NAD(P)H oxydase est composée de plusieurs sous-unités membranaires (gp91phox (Nox) et p22phox) et cytosoliques (p47phox, p67phox et Rac) (Ceolotto et al., 2006; Lyle et Griendling, 2006) (figure 13). Les sous-unités catalytiques Nox1 et Nox4 sont habituellement retrouvées dans les CMLV aortiques des rongeurs, alors que Nox5 est retrouvé chez l'humain (Lyle et Griendling, 2006).



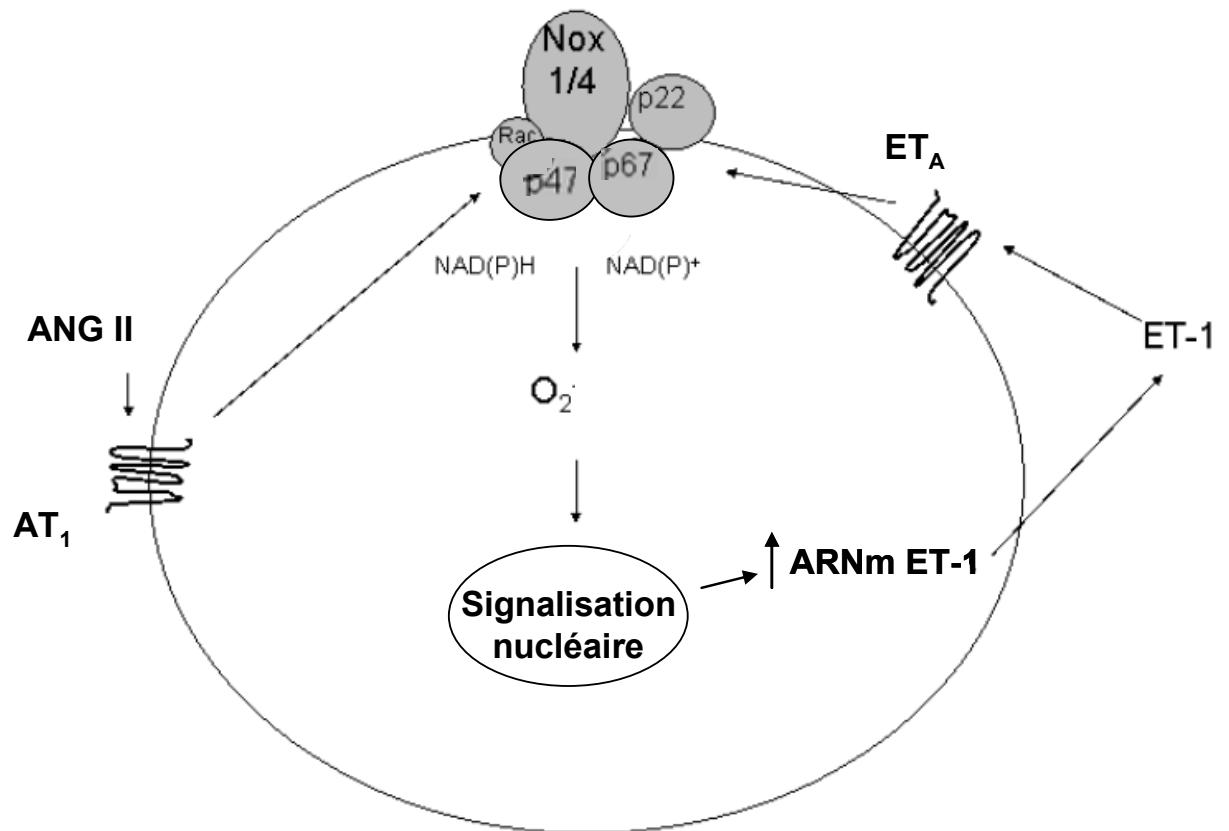
**Figure 13: Structure de la NAD(P)H oxydase.**

**Abréviations :**  $O_2$ : oxygène; NAD(P)H nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate);  $H^+$ : ion hydrogène; NAD(P)+: nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit;  $O_2^-$ : anion superoxyde. [Inspiré de Griendling, Sorescu et Ushio-Fukai, 2000]



L'activation de la NAD(P)H oxydase est une source intracellulaire majeure de radicaux libres menant à l'activation d'une variété d'évènements de signalisation causant ultimement une dysfonction endothéliale, la prolifération des CMLV, l'expression de cytokines pro-inflammatoires, l'inflammation, l'hypertrophie, la transcription de gènes et la migration cellulaire (Cai, Griendling, et Harrison, 2003; Ellmark, Dusting, Fui, Guzzo-Pernell, et Drummond, 2005; Griendling et al., 2000; Taniyama et Griendling, 2003). Dans des cas pathologiques (hyperinsulinémie, diabète, hypertension), la NAD(P)H oxydase peut être suractivée, ce qui occasionne des effets délétères (dommages à l'ADN et aux protéines) (Laplane et de Champlain, 2006).

La source majeure de production des ERO dans les tissus vasculaires est la NAD(P)H oxydase; son activité ainsi que la synthèse de ses sous-unités sont augmentées par l'Ang II dans les CMLV et les cellules endothéliales (Gragasin, Xu, Arenas, Kainth, et Davidge, 2003; Laplane et al., 2005; Seshiah et al., 2002). Lorsqu'on stimule des CMLV avec de l'Ang II, on observe deux phases de production d'anion superoxyde avec l'implication de mécanismes différents. La première phase est indépendante de la production d'ET-1 et apparaît après 10 à 20 minutes (Laplane et al., 2005). La deuxième phase de production d'anion superoxyde par l'Ang II apparaît au moment de la relâche d'ET-1. Ainsi, la deuxième phase de stress oxydatif semble dépendante de la production d'ET-1 (Laplane et al., 2005). Les récepteurs qui semblent impliqués dans la production d'ERO par la NAD(P)H oxydase dans les CMLV sont le récepteur AT<sub>1</sub> de l'Ang II et le récepteur ET<sub>A</sub> de l'ET-1 (Hong et al., 2004; Laplane et al., 2005) (figure 14).



**Figure 14: Rôle de l'endothéline-1 dans la production du stress oxydatif par l'angiotensine II.**

**Abréviations :** ANG II : angiotensine II ;  $O_2^{\cdot -}$  : anion superoxyde, NAD(P)H nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate); NAD(P)<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit; ET-1 : endothéline-1. [Modifié de Laplante et de Champlain, 2006]

Dans les CMLV ou les vaisseaux isolés, l'ET-1 à elle seule peut aussi augmenter la production d'anion superoxyde par l'intermédiaire de la NAD(P)H oxydase (Li et al., 2003). De plus, l'exposition de CMLV ou de cellules endothéliales à un générateur de ERO peut mener à l'augmentation de l'expression de l'ET-1 et de l'enzyme de conversion de l'ET (Lopez-Ongil et al., 2002; Ruef, Moser, Kubler, et Bode, 2001). Ceci démontre la relation de stimulation réciproque entre les ERO et l'ET-1.

### **4.2.2. L'oxyde nitrique synthase découplée**

Il existe trois formes enzymatiques de NO synthase (NOS) : endothéliale (eNOS), neuronale (nNOS) et inductible (iNOS) (Ortiz et Garvin, 2003). Ces NOS sont potentiellement importantes dans la régulation de la pression artérielle (Ortiz et Garvin, 2003). Ces enzymes consomment l'arginine pour produire le NO vasodilatateur (Lassègue et Griendling, 2004). Par contre, lorsqu'il y a une baisse d'arginine ou du cofacteur tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), la NOS est découplée et elle produit l'anion superoxyde en plus du NO (Lassègue et Griendling, 2004). Le NO réagit avec l'anion superoxyde et génère du peroxynitrite. Ce dernier peut oxyder le BH<sub>4</sub> et provoquer davantage le découplage de NOS (Kuzkaya, Weissmann, Harrison, et Dikalov, 2003). C'est ce qui peut expliquer pourquoi, dans le modèle de rat spontanément hypertendu (SHR), l'anion superoxyde est augmenté et la production de NO diminuée malgré le fait que l'expression et l'activité de la NOS soient augmentées (Lassègue et Griendling, 2004). Il est à noter que des études suggèrent que la NAD(P)H oxydase soit en partie responsable du découplage de la eNOS (Landmesser et al., 2003; Zheng et al., 2003).

### **4.2.3. La mitochondrie**

Dans des conditions physiologiques, la chaîne de transport d'électrons produit de manière constitutive l'anion superoxyde qui est rapidement dégradé par la superoxyde dismutase à manganèse (Mn-SOD) (Lassègue et Griendling, 2004). Par contre, une mauvaise défense antioxydante peut mener à la surproduction d'ERO par la mitochondrie dans des conditions pathologiques. Par exemple, il a été démontré que des mitochondries isolées de cœur de rat hypertendu produisent une quantité excessive d'anion superoxyde (El Midaoui, Elimadi, Wu, Haddad, et de Champlain, 2003). De plus, chez le rat infusé à l'Ang II, l'activité de la Mn-SOD est fortement diminuée dans le rein, ce qui diminue l'élimination des ERO (Guo et al., 2003).

#### **4.2.4. La xanthine oxydase**

La xanthine oxydase (XO) est une enzyme qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine dans la voie du métabolisme des purines (Puddu, Puddu, Cravero, Rosati, et Muscari, 2008). Elle agit en réduisant l'état d'oxydation du NADH<sup>+</sup>, qui aboutit à la production d'anion superoxyde et, par conséquent, à la mauvaise régulation de la fonction vasculaire (Lassègue et Griendling, 2004; Meneshian et Bulkley, 2002). La XO est activée par des médiateurs pro-inflammatoires et est augmentée par l'activité de la NAD(P)H oxydase (Puddu et al., 2008). L'activation de la XO peut aussi contribuer à la dysfonction de la signalisation rédox menant à l'altération d'expression de gènes et de protéines (Li et Shah, 2004).

### **4.3. Les voies d'élimination des espèces réactives oxygénées**

Les molécules dites antioxydantes ont pour rôle d'empêcher les ERO d'atteindre leurs cibles biologiques, d'où leur fonction de protecteurs chimiques. Parmi celles-ci, on retrouve la superoxyde dismutase, la catalase et les molécules antioxydantes (figure 12).

#### **4.3.1. La superoxyde dismutase et la catalase**

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme généralement homotétramérique qui catalyse l'élimination de l'anion superoxyde en le transformant en peroxyde d'hydrogène (Faraci et Didion, 2004). Ce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est ensuite converti en oxygène et en eau par la catalase. Les trois types de SOD retrouvés chez les mammifères sont la Cu/Zn-SOD, la Mn-SOD et la Fe-SOD. Ces SOD se différencient entre elles par leur localisation et par leur cofacteur métallique situé au niveau de leur site actif. La Cu/Zn-SOD est localisée dans le cytosol et contient du cuivre et du zinc. La Mn-SOD, présente dans la mitochondrie, contient du manganèse (Mn-SOD), alors que la Fe-SOD est localisée dans le milieu extracellulaire et contient du fer (Faraci et Didion, 2004). Dans des modèles d'hypertension

comme le SHR, le rat infusé à l'Ang II ou encore le rat soumis à une diète riche en sel (Chu et al., 2003; Lassègue et Clempus, 2003; Lassègue et Griendling, 2004; Yang et al., 2003), il a été démontré que l'augmentation de l'expression de la SOD et de la catalase peut aider à normaliser l'élévation d'un type d'ERO, ce qui augmente la biodisponibilité du NO endothélial pour la vasorelaxation. De plus, dans l'aorte de souris génétiquement hypertensives, il a été observé que l'activité de la catalase est fortement diminuée, alors que l'activité de la SOD, plus particulièrement celle de la Mn-SOD, est augmentée, ce qui mène à l'augmentation du  $H_2O_2$  dans ces tissus aortiques (Uddin, Yang, Shi, Polley-Mandal, et Guo, 2003). Ainsi, la diminution ou l'augmentation d'enzymes antioxydantes endogènes peuvent contribuer à l'augmentation des ERO spécifiques observée dans des modèles d'hypertension.

#### **4.3.2. Les molécules antioxydantes**

Les thiols, comme le glutathion ou son précurseur le N-acétyl-L-cystéine (NAC), sont des molécules antioxydantes non enzymatiques qui ont une fonction de chélateur et, donc, de neutralisateurs des ERO (Yu, 1994; Zafarullah, Li, Sylvester, et Ahmad, 2003). L'ascorbate (vitamine C) et le d- $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) sont des agents réducteurs qui captent les radicaux libres oxygénés et les neutralisent (Chen, Touyz, Park, et Schiffrin, 2001). Une diète riche en vitamines C et E diminue la pression artérielle chez des modèles expérimentaux d'hypertension comme le rat SHR (Chen et al., 2001).

### **4.4. Lien entre le stress oxydatif et le récepteur B<sub>1</sub> des kinines**

De plus en plus d'études mettent en lumière l'implication du stress oxydatif dans l'induction du RB<sub>1</sub>. Puisque le NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription sensible à la présence des ERO (Taniyama et Griendling, 2003), il est normal de vouloir faire un lien entre le stress oxydatif et l'augmentation du RB<sub>1</sub> observée dans plusieurs modèles. Par exemple, une infusion chronique d'Ang II induit l'expression d'un RB<sub>1</sub> fonctionnel dans l'aorte de rat

Wistar, et ceci implique l'anion superoxyde formé par le NAD(P)H oxydase et l'activation du NF- $\kappa$ B (Ceravolo et al., 2007). De plus, chez le rat rendu hypertendu avec l'Ang II et dans un modèle de résistance à l'insuline produit par une consommation élevée en glucose, l'expression du RB<sub>1</sub> est augmentée dans plusieurs tissus en association avec la surproduction de l'anion superoxyde vasculaire. Ces effets ont été corrigés par le NAC ou par un régime enrichi en acide  $\alpha$ -lipoïque, deux puissants antioxydants (Ismael, Talbot, Carbonneau, Beausejour, et Couture, 2008; Lungu et al., 2007; Petcu et al., 2005), ce qui soutient le rôle important du stress oxydatif dans l'induction de RB<sub>1</sub>.

## 5. Hypothèse et objectifs

Plusieurs études ont montré qu'il existe un lien entre le stress oxydatif et l'expression du  $RB_1$  des kinines. Certaines de ces études se sont intéressées au rôle que pourrait avoir l'Ang II dans cette augmentation d'expression du  $RB_1$ , mais, à notre connaissance, aucune n'a réussi à démontrer le mécanisme d'action. Sachant que l'Ang II peut libérer l'ET-1 (un autre peptide vasoactif prooxydant), il est possible que l'effet de l'Ang II sur l'induction du  $RB_1$  dérive de l'ET-1. De plus, sachant que les taux circulants d'ET-1 et d'Ang II sont augmentés dans des pathologies où le  $RB_1$  est lui aussi augmenté, tels le diabète et l'hyperglycémie (Collier et al., 1992; Keynan et al., 2004; Lavrentyev, Estes, et Malik, 2007; Lewis, Hunsicker, Bain, et Rohde, 1993; Saito, Nishi, Fukumoto, Weiss, et Latifpour, 1996), nous émettons l'hypothèse que ces deux vasopeptides contribuent à l'augmentation de l'expression du  $RB_1$  dans ces pathologies. Dans notre étude, le modèle choisi est la culture *in vitro* de cellules du muscle lisse vasculaire dérivées de l'aorte thoracique de rat, puisque ce modèle est facilement accessible et que plusieurs études ont déjà été effectuées dans ce modèle. Nous utilisons des CMLV dérivées directement de l'aorte de rat Sprague-Dawley et des CMLV d'une lignée immortalisée nommée A10. Les objectifs de notre étude consistent à :

1. Étudier l'expression du  $RB_1$  en présence d'Ang II et d'ET-1 en fonction de la concentration et du temps d'exposition;
2. Étudier les récepteurs responsables de l'action de l'Ang II et de l'ET-1 dans l'induction du  $RB_1$  par l'intermédiaire d'antagonistes;
3. Étudier la signalisation cellulaire par laquelle la modulation du  $RB_1$  a lieu dans les CMLV isolées en culture, en vérifiant l'implication du stress oxydatif, des voies de ERK1/2 et de PI3K, ainsi que du facteur de transcription nucléaire NF- $\kappa$ B.

## **CHAPITRE 2 – ARTICLE SCIENTIFIQUE**



Soumis en août 2009 à l'*American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*.

## **Kinin B<sub>1</sub> receptor upregulation by angiotensin II and endothelin-1 in rat vascular smooth muscle cells: Receptors and mechanisms**

MARIELLE MORAND-CONTANT, MADHU B. ANAND-SRIVASTAVA AND  
RÉJEAN COUTURE\*

Department of Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal,  
Québec, Canada, H3C 3J7

\*Correspondence and request for reprint:

Dr Réjean Couture  
Department of Physiology  
Faculty of Medicine  
Université de Montréal  
C.P. 6128  
Succ. Centre-Ville  
Montréal (Québec) H3C 3J7  
Canada

Tel: 1-514-343-7060  
Fax: 1-514-343-2111  
e-mail:

Running head

Upregulation of B<sub>1</sub> receptor by ANG II and ET-1

## **Abstract**

We have previously reported an increased expression of kinin B<sub>1</sub>R in several tissues from rat models of diabetes and hypertension. Since the levels of angiotensin II (ANG II) and endothelin-1 (ET-1) are increased in these pathologies, we undertook the present study to examine if these vasoactive peptides could increase the expression of B<sub>1</sub>R in vascular smooth muscle cells (VSMC) using A10 cell line and aortic VSMC. ANG II treatment of A10 and aortic VSMC enhanced the expression of B<sub>1</sub>R in a concentration- and time-dependent manner (maximal at 1  $\mu$ M and at 6 h). ANG II also increased B<sub>1</sub>R mRNA expression at 3 h. The enhanced expression of B<sub>1</sub>R proteins was restored to control levels by an AT<sub>1</sub> receptor antagonist (losartan), but not by PD123319, an AT<sub>2</sub> receptor antagonist. ET<sub>B</sub> receptor antagonist (BQ788) had no inhibitory effect, whereas ET<sub>A</sub> receptor antagonist (BQ123) blocked the effect of ANG II at 6-8 h, but not at early time. ANG II-induced expression of B<sub>1</sub>R was inhibited by wortmannin and MG132, inhibitors of PI3kinase and proteasom respectively, but not by PD098059, a MEK inhibitor. Furthermore, treatment of A10 and aortic VSMC with ET-1 also increased the levels of B<sub>1</sub>R protein which was blocked by BQ123 and BQ788. Antioxidants (N-acetyl-L-cysteine and diphenyleneiodonium) abolished ANG II and ET-1-induced B<sub>1</sub>R protein expression. Results suggest that ANG II enhanced B<sub>1</sub>R expression in VSMC through AT<sub>1</sub> receptor in the early phase and subsequently by releasing ET-1 and activating ET<sub>A</sub>. This occurs through the oxidative stress and activation of PI3kinase and NF- $\kappa$ B.

## **Keywords**

Kinin B<sub>1</sub> receptor, oxidative stress, angiotensin II, endothelin-1, vascular smooth muscle cells

## INTRODUCTION

Kinins are polypeptides formed locally after tissue damage or inflammation (23) and exert various physiological and pathological effects, including smooth muscle contraction, vasodilatation through the release of nitric oxide (NO) and prostaglandins by endothelial cells, increased vascular permeability, induction of pain, and mitogenesis (6; 10; 21; 23). Kinins signal through the activation of two G protein-coupled receptors (GPCR) : B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R) and B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R) (33). B<sub>2</sub>R is constitutively expressed in a variety of tissues and cell lines (23) and relays the majority of the vascular actions of bradykinin (BK). B<sub>1</sub>R is not constitutively expressed since it is not present in a significant amount in normal tissue, but its expression is increased during tissue injury or by exposure to cytokines or oxidative stress (7). This induction can occur in a variety of cell types, including vascular smooth muscle cells (VSMC), endothelial cells, cardiomyocytes and fibroblasts (21; 27).

Pro-oxidative peptides such as angiotensin II (ANG II) and endothelin-1 (ET-1) may contribute to B<sub>1</sub>R overexpression in cardiovascular diseases. Effects of ANG II are mediated by two GPCR, AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> (38). The AT<sub>1</sub> receptor relays the majority of physiological actions of ANG II and is expressed in normal adult tissues, while the AT<sub>2</sub> receptor is highly expressed in fetal tissues and decreases rapidly after birth and occurs in small amount in some adult tissues (37; 39; 43). ANG II stimulates the synthesis (14) and the release of ET-1 (22). ET-1, a peptide of 21 amino acids, is mainly produced by endothelial cells (31), yet other cell types such as cardiomyocytes and VSMC may also produce this peptide (11). Effects of ET-1 are similar to those produced by ANG II such as vasoconstriction, cell proliferation and production of free radicals (22). The effects of ET-1

are mediated by two GPCR namely ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> (31). In blood vessels, ET<sub>A</sub> receptor is mainly expressed in VSMC and relays vasoconstriction, whereas ET<sub>B</sub> receptor, mainly expressed in endothelial cells, causes vasodilation by producing NO (34). ET<sub>B</sub> receptor may also relay the contraction of blood vessels when expressed in VSMC (34).

Although some studies have shown the effect of ANG II on kinin receptors expression, none have attempted to demonstrate putative interaction between ANG II and ET-1 on B<sub>1</sub>R induction. Thus, this study was designed to assess the direct effects of ANG II and ET-1 and their interplay on the induction of kinin B<sub>1</sub>R in VSMC. The implication of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) such as extracellular signals regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2), the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3kinase) pathway, the nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and the oxidative stress were studied as putative mechanisms of B<sub>1</sub>R induction by ANG II and ET-1. Two models of VSMC were used: VSMC freshly derived from thoracic aorta of Sprague-Dawley rat and VSMC A10 cell line derived from embryonic rat thoracic aorta. A10 cells have the advantage to be commercially available and to be cultured for a longer period of time without changing phenotype (20).

## MATERIALS AND METHODS

### *Animal preparation*

Male Sprague-Dawley (SD) rats (200-225 g; 6-8 weeks old) purchased from Charles River (Saint-Constant, Québec, Canada) were maintained on a standard rat chow diet and tap water *ad libitum* with a 12 h:12 h light-dark cycle in a quiet environment. The SD rats were euthanized with CO<sub>2</sub> and the aortas were dissected out and used for cell culture. This study was performed according to guidelines and principles of the Canadian Council on Animal Care and approved by the Animal Care Committee of our University.

### *Cell culture and incubation*

The VSMC A10 cell line derived from embryonic rat thoracic aorta was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA). The two types of VSMC (A10 and aortic cells) were cultured as described previously (3). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing normal glucose (5.5 mM), 10 % Fetal Bovine Serum (FBS), and 1% antibiotic-antimycotic (containing penicillin, streptomycin and amphotrecin B) at 37°C in 95% room air-5% CO<sub>2</sub> as described previously (13). The cells were passaged upon reaching confluence with 0.5% trypsin and used between passages 3 and 20 for A10 and passages 2 to 8 for aortic VSMC. The confluent VSMC after 24 h of incubation in DMEM with 1% FBS were exposed to different periods of time and concentrations of ANG II (0-24 h; 1 nM to 10 µM) or ET-1 (0-6 h). For receptor antagonists studies, VSMC were incubated overnight in the absence or presence of antagonists of AT<sub>1</sub> (losartan, 10 µM), AT<sub>2</sub> (PD123319, 10 µM), ET<sub>A</sub> (BQ123, 1 µM) or

ET<sub>B</sub> (BQ788, 1  $\mu$ M) receptors and stimulated by ANG II (1  $\mu$ M, 6 h) or ET-1 (100 nM, 2 h). The implication of ERK1/2 and PI3kinase in the effect of ANG II (1  $\mu$ M, 6 h) was investigated by using specific inhibitors, PD098059 (10  $\mu$ M) and wortmannin (100 nM), respectively. To confirm the implication of NF- $\kappa$ B, a pretreatment of 30 min with an inhibitor of proteasom (MG132, 10  $\mu$ M) on VSMC was performed with or without stimulation with ANG II (1  $\mu$ M, 6 h) or IL-1 $\beta$  (10 ng/mL, 6h) used as a positive control. Finally, effects of antioxidants on B<sub>1</sub>R expression were measured on VSMC by adding N-acetyl-L-cysteine (NAC, 2 mM) or diphenyleneiodonium (DPI, 10  $\mu$ M) overnight and before stimulation with ANG II (1  $\mu$ M, 6 h) or ET-1 (100 nM, 2 h). Most of these treatments (concentration and time) were based on work already done in the past (8; 12; 24).

#### *Cell extracts*

After incubation, VSMC were washed twice with ice-cold phosphate buffered saline (PBS) and lysed in 200  $\mu$ l buffer containing 25 mM Tris·HCl (pH 7.5), 25 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 1 % Triton X-100, 0.1 % sodium dodecyl sulfate and 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin on ice. The cell lysates were centrifuged at 12 000 RPM for 5 min at 4°C, and the supernatants were used for Western blot analysis. Cell viability was checked with the trypan blue exclusion technique and indicated that >90 ~ 95% cells were viable, like described previously (4).

*Western blot analysis*

Western blot analysis was performed as described previously (2). After sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the separated proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) with a Trans-Blot SD semi-dry apparatus (Bio-Rad) at 15 V for 45 min. After transfer, the membranes were incubated in PBS with 0.5% Tween-20 (PBS-Tween) containing 5% skim milk at room temperature for 2 h. The blots were cut in two pieces (around 50 kDa) and then incubated with specific antibodies. One was incubated with B<sub>1</sub>R antibody (M-19, 1:750) in PBS-Tween containing 1.5% skim milk at 4°C overnight. The other piece was incubated with rat dynein specific antibody (74-1, 1:5000) in PBS-Tween at 4°C overnight for standardization of B<sub>1</sub>R expression. The blots were washed three times with PBS-Tween and the antigen-antibody complexes were detected by incubating the blots with bovine anti-goat IgG (Bio-Rad) conjugated with horseradish peroxidase (1:5000) for B<sub>1</sub>R detection or goat anti-mouse IgG (Bio-Rad) conjugated with horseradish peroxidase (1:5000) for dynein detection, both in PBS-Tween containing 5% skim milk for 1 h at room temperature. The blots were then washed three times with PBS-Tween before the reaction with enhanced-chemiluminescence, Western blotting detection reagents (Amersham). The B<sub>1</sub>R antibody and the dynein antibody detected a single band at 35 kDa and 74 kDa, respectively. A quantitative analysis of the protein was performed by densitometric scanning of the autoradiographs employing the enhanced laser densitometer, LKB Ultrosan XL, and quantified using the gel-scan XL evaluation software (version 2.1) from Pharmacia (Baie d'Urfé, Québec, Canada).

*Quantitative real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)*

After incubation, total cellular RNA from rat A10 VSMC was extracted with RNeasy Mini Kit, and a cDNA copy was synthesized using the QuantiTect Reverse Transcription kit, according to manufacturer's instructions (QIAGEN Inc., Mississauga, Canada). Quantitative real-time PCR was performed in SYBR Green Master mix (QIAGEN, Valencia, CA) with 300 nM of each primer and signal detected using the DNA Engine Opticon 2 PCR apparatus (MJ Research Inc, Waltham, MA, USA). For standardization and quantification, rat 18S was amplified. The following primer pairs were designed by Vector NTI software and used: 5' GCA GCG CTT AAC CAT AGC GGA AAT 3' (forward, 367–391) and 5' CCA GTT GAA ACG GTT CCC GAT GTT 3' (reverse, 478–454) for amplification of rat B<sub>1</sub>R (GenBank accession no. NM\_030851); 5' TCA ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT 3' (forward, 363–386) and 5' TCC TTG GAT GTG GTA GCC GTT TCT 3' (reverse, 470–447) for amplification of rat 18S (GenBank accession no. X01117). PCR conditions were as follows: 95 °C for 15 min, followed by 46 cycles at 94 °C for 15 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. The cycle threshold (C<sub>t</sub>) value represents the cycle number at which a fluorescent signal rises statistically above background. The relative quantification of gene expression was analysed by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method (25). Real-time PCR was made on duplicates for each sample and a blank control (no template) was included in all the experiments for negative controls.



*Drugs and reagents*

ANG II, ET-1, losartan, PD123319, BQ123, BQ788, wortmannin, PD098059, DPI and NAC were purchased from Sigma-Aldrich Canada. The B<sub>1</sub>R antibody (M-19) and dynein antibody (74-1) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Other drugs were MG132 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) and IL-1 $\beta$  (Cell Sciences, Canton, MA, USA).

*Statistical analysis*

Data were expressed as means  $\pm$  SEM of  $n$  samples. B<sub>1</sub>R protein expression was expressed relative to dynein levels and B<sub>1</sub>R mRNA expression was expressed relative to 18S levels. Statistical analysis of data was performed with GraphPad Prism software. Results were analysed by one-way ANOVA in conjunction with a Bonferroni test where applicable or by one-way ANOVA followed by Dunnett's test for multiple comparisons with one control group. A difference between groups was considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### *ANG II upregulates B<sub>1</sub>R protein level*

To investigate the modulation of B<sub>1</sub>R by ANG II, we examined the effect of different concentrations of ANG II on the expression of B<sub>1</sub>R in A10 as well as in aortic cells. As shown in Fig. 1A, ANG II increased the expression of B<sub>1</sub>R protein levels in a concentration-dependent manner, with maximal stimulation at 1  $\mu$ M in A10 cells. Control cells also displayed a basal expression of B<sub>1</sub>R. Primary cultured aortic VSMC stimulated with ANG II (Fig. 1B) also showed a peak of B<sub>1</sub>R expression at 1  $\mu$ M, although 10 nM produced a highly significant response contrary to A10 cells.

We also examined optimal time for increased expression of B<sub>1</sub>R by 1  $\mu$ M ANG II. This concentration of ANG II was selected because it evoked the maximal induction of B<sub>1</sub>R. As shown in A10 cells, B<sub>1</sub>R protein levels were increased at 3 h and a peak was obtained at 6 h (Fig. 1C). The induction was not completely back to basal level at 16 h and 24 h post- ANG II stimulation. Appropriate control performed at each end point after ANG II stimulation confirmed that basal level of B<sub>1</sub>R did not change over time (data not shown). In aortic VSMC, ANG II (1  $\mu$ M) showed a similar profile of B<sub>1</sub>R induction with a peak at 6 h and significant increases at 1 h and 3 h (Fig. 1D). These results show that A10 cells are quite representative of aortic VSMC and therefore were used in the following experiments aimed at characterizing the ANG II response on B<sub>1</sub>R expression.

### *ANG II upregulates B<sub>1</sub>R mRNA level*

To determine if ANG II (1  $\mu$ M) increased the expression of B<sub>1</sub>R mRNA, QRT-PCR was performed on A10 cells. As depicted in Fig. 2, levels of B<sub>1</sub>R mRNA were increased in a time-dependent manner 1-6 h and the maximal stimulation was observed at 3 h of stimulation. B<sub>1</sub>R mRNA returned to control levels after 24 h of treatment.

### *AT<sub>1</sub> is implicated in the upregulation of B<sub>1</sub>R by ANG II*

To determine which ANG II receptor subtype was implicated in the induction of B<sub>1</sub>R, two selective antagonists were used: losartan for AT<sub>1</sub> receptor and PD123319 for AT<sub>2</sub> receptor (38). Results in Fig. 3 show that inhibition of the AT<sub>2</sub> receptor did not significantly alter the increased expression of B<sub>1</sub>R in response to ANG II. In contrast, ANG II-induced increased expression of B<sub>1</sub>R protein was significantly blocked by losartan. AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors antagonists did not have any effect on basal expression of B<sub>1</sub>R. These results suggest that ANG II modulates the expression of B<sub>1</sub>R via activation of AT<sub>1</sub> receptor.

### *PI3kinase activated by ANG II contributes to the upregulation of B<sub>1</sub>R*

To investigate the role of ERK1/2 and PI3kinase in the upregulation of B<sub>1</sub>R by ANG II, specific inhibitors were used: PD098059 which prevents the activation of ERK1/2 by MEK (1) and wortmannin which interacts with the catalytic subunit of PI3kinase (p110 $\alpha$ ) (41). Results indicate that wortmannin prevented the upregulation of B<sub>1</sub>R induced by ANG II while PD098059 had no significant effect (Fig. 4). However, these two

inhibitors had no effect on basal expression of B<sub>1</sub>R. These results suggest that ANG II induces increased expression of B<sub>1</sub>R protein via the PI3kinase pathway.

*NF-κB activated by ANG II and IL-1β contributes to the upregulation of B<sub>1</sub>R*

NF-κB is a transcription factor involved in the increased expression of B<sub>1</sub>R (23). To determine the implication of NF-κB in the response to ANG II, quiescent VSMC (A10 cells) were pretreated with an inhibitor of proteasom (MG132) (19). IL-1β was used as a positive control for the upregulation of B<sub>1</sub>R (26). As shown in Fig. 5, MG132 attenuated the upregulation of B<sub>1</sub>R induced by ANG II and IL-1 β. This inhibitor had no effect on B<sub>1</sub>R basal expression. These results suggest that ANG II induces B<sub>1</sub>R via the activation of NF-κB.

*Implication of ET<sub>A</sub> receptor in the upregulation of B<sub>1</sub>R expression by ANG II*

Since ANG II can increase the levels of ET-1, it was of interest to investigate the implication of ET-1 in ANG II-induced enhanced expression of B<sub>1</sub>R. To test this, we used selective antagonists of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors, BQ123 (15) and BQ788 (16), respectively. As shown in Fig. 6, inhibition of ET<sub>B</sub> receptor did not significantly alter the increased expression of B<sub>1</sub>R in response to ANG II. However, inhibition of ET<sub>A</sub> receptor abolished the ANG II-induced increased expression of B<sub>1</sub>R. The antagonists for ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> alone did not have significant effect on B<sub>1</sub>R basal expression. These results suggest that the increased B<sub>1</sub>R expression by ANG II is mediated via the activation of ET<sub>A</sub> receptor. As illustrated in Fig. 7, BQ123 had no significant effect on ANG II-induced expression of B<sub>1</sub>R

at 1, 2, 3 and 4 h, but caused a complete inhibition after 6 h and 8 h of stimulation with ANG II. This suggests that ET<sub>A</sub> receptor intervenes not in the early, but in the secondary phase of stimulation with ANG II.

#### *B<sub>1</sub>R-induced upregulation by exogenous ET-1 treatment*

To investigate if exogenous ET-1 can induce B<sub>1</sub>R expression, the effect of ET-1 on the expression of B<sub>1</sub>R was examined in A10 and aortic VSMC with various period of time. The results showed in Fig. 8 indicated that ET-1 increased the expression of B<sub>1</sub>R in a time-dependent manner, a maximal response was observed at 2 h which remained elevated up to 4 h in both cell types and thereafter declined.

#### *Implication of both ET-1 receptors in B<sub>1</sub>R upregulation by ET-1*

To determine which ET-1 receptor subtype was implicated in B<sub>1</sub>R induction under treatment with ET-1, selective antagonists for each receptor were used: BQ123 for ET<sub>A</sub> receptor and BQ788 for ET<sub>B</sub> receptor. Results in Fig. 9 show that both antagonists blocked the increased expression of B<sub>1</sub>R in response to ET-1. The antagonists for ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> did not have a significant effect on B<sub>1</sub>R basal expression.

#### *Oxidative stress produced by ANG II and ET-1 contributes to the upregulation of B<sub>1</sub>R*

To investigate the role of oxidative stress in the upregulation of B<sub>1</sub>R, two antioxidants were used on A10 cells: diphenyleneiodonium (DPI), an inhibitor of flavoenzymes such as NAD(P)H oxidase (29), and N-acetyl-L-cysteine (NAC), a scavenger

of ROS (42). As shown in Fig. 10, either antioxidant prevented the upregulation of B<sub>1</sub>R induced by the two peptides. The antioxidants had no direct effect on the basal expression of B<sub>1</sub>R. These results suggest that ANG II and ET-1 induce B<sub>1</sub>R via the oxidative stress.

## DISCUSSION

In the present study, we have shown that vasoactive peptides such as ANG II and ET-1 increased the expression of B<sub>1</sub>R protein by oxidative stress in VSMC. First, we have shown that B<sub>1</sub>R expression is increased by ANG II in a time and concentration-dependent manner. We showed that maximum B<sub>1</sub>R mRNA induction by ANG II was observed at 3 h and declined to basal level after 24 h of treatment and this is consistent with an earlier study in cultured VSMC (21). The decreasing effect at 16 and 24 h is likely attributed to the metabolic degradation of ANG II. Our study extended this finding by demonstrating that the upregulation of B<sub>1</sub>R also occurs at protein level at 6 h and at 1  $\mu$ M. The majority of vascular actions of ANG II are mediated by AT<sub>1</sub> receptor which is predominantly expressed in VSMC (39). The AT<sub>2</sub> receptor is almost undetectable in this cell type, but is present in the adventitia (39; 43). Our data showed that ANG II-induced enhanced expression of B<sub>1</sub>R in VSMC was inhibited by losartan (AT<sub>1</sub> antagonist), but not by PD123319 (AT<sub>2</sub> antagonist) and this is consistent with the study reported earlier on B<sub>1</sub>R mRNA in VSMC (21). In addition, the upregulation of B<sub>1</sub>R by endogenous ANG II through AT<sub>1</sub> receptor has also been reported in endothelium of small cardiac arteries and cardiomyocytes from model of two-kidney-one-clip hypertensive rats (9).

Another mechanism how ANG II can increase B<sub>1</sub>R expression can be by the ET-1 pathway. It is known that ANG II may stimulate the production (synthesis and release) of ET-1 in VSMC (11; 14). In our study, results revealed that ANG II-induced expression of B<sub>1</sub>R was completely blocked by ET<sub>A</sub> antagonist after 6-8 h, suggesting that endogenous ET-1 mediates the long term effect of ANG II. This is consistent with a recent study (22)

which showed an increase of ET-1 level in cultured medium of aortic rat VSMC after 6h of stimulation with 1  $\mu$ M ANG II. Hence, our study suggests that ET-1 is a key mediator in the sustained increased expression of B<sub>1</sub>R in VSMC stimulated by ANG II. This statement is further supported by our observation that exogenous ET-1 can induce B<sub>1</sub>R in our two models of VSMC in a time-dependent manner. Usually, ET-1 acts through ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors and these receptors are both found in VSMC and most predominantly ET<sub>A</sub> receptor (34; 36). In our study, exogenous ET-1 seems to operate through both ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> to enhance expression of B<sub>1</sub>R, because of the fact that antagonist of both ET-1 receptors subtypes, BQ123 and BQ788, were able to inhibit ET-1-induced B<sub>1</sub>R upregulation. This is in keeping with the presence of both ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors in VSMC (34).

Stimulation of VSMC by ANG II or ET-1 cause increases of intracellular calcium and activation of PKC, MAPK and ROS production (36; 39). These second messengers have been identified in vascular complications associated with ANG II and ET-1 such as cell proliferation, hypertrophy and hyperplasia (34; 39; 40). Thus, a possible mechanism by which these vaso peptides may modulate the expression of B<sub>1</sub>R is via the generation of ROS. Our study showed that ANG II as well as ET-1-induced increased expression of B<sub>1</sub>R was attenuated to control levels by DPI and NAC which supports that increased oxidative stress may contribute to the enhanced expression of B<sub>1</sub>R by ANG II and ET-1. The role of oxidative stress in enhanced expression of B<sub>1</sub>R by chronic glucose feeding in rat has also been shown (17). Since DPI prevents the assembly of NAD(P)H oxidase subunits and that NAC neutralizes free radicals, this study demonstrates that the assembly of the NAD(P)H



oxidase and its activity (production of ROS) may be involved in the induction of B<sub>1</sub>R stimulated by ANG II and ET-1. It is known that ANG II via ROS can activate NF- $\kappa$ B and stimulate degradation of its cytosolic inhibitor, I $\kappa$ B (32). Moreover, chronic infusion of ANG II induced functional B<sub>1</sub>R in rat aorta and spinal cord which was associated with the higher production of superoxide anion production by NAD(P)H oxidase and NF- $\kappa$ B activation (5; 30). Thus, ANG II and ET-1 may promote the induction of B<sub>1</sub>R through the production of ROS and the subsequent activation of NF- $\kappa$ B in the A10 model of VSMC.

BK and ANG II share common signalling pathways leading to changes in vascular tone and architecture (26; 39). One of these mechanisms is MAPK pathways and the best characterized is the ERK1/2 pathway. It was shown that ERK1/2 is important for NF- $\kappa$ B activation by IL-1 $\beta$  (a stimulus that can upregulate B<sub>1</sub>R) in a persistent stimulation, but not in a rapid and transient stimulation (18). However, it appears that ERK1/2 may not be implicated in ANG II-induced enhanced expression of B<sub>1</sub>R, because PD098059, a MEK inhibitor, was unable to restore to control level the enhanced expression of B<sub>1</sub>R in VSMC. Our study demonstrating that wortmannin, an inhibitor of PI3kinase, prevented the upregulation of B<sub>1</sub>R induced by ANG II supports the role of PI3kinase in ANG II-induced increased expression of B<sub>1</sub>R. In this regard, ANG II, through AT<sub>1</sub> receptor, has been shown to activate PI3kinase in a dose-dependent manner *in vivo* and *in vitro* in VSMC (35). ANG II has been reported to increase protein kinase B (Akt) and the transcription factors NF- $\kappa$ B in VSMC (28). NF- $\kappa$ B is the transcription factor that allows the increased expression of B<sub>1</sub>R (23). We also showed a role of NF- $\kappa$ B in ANG II-induced expression of B<sub>1</sub>R, because MG132, an inhibitor of proteasom, attenuated the ANG II-induced expression

of B<sub>1</sub>R in VSMC. Taken together, it can be suggested that ANG II-induced expression of B<sub>1</sub>R may be attributed to PI3kinase and the transcriptional factor NF- $\kappa$ B, but not to ERK1/2.

In summary, we showed that ANG II and ET-1 increase the expression of B<sub>1</sub>R in aortic and A10 VSMC. ANG II per se can induce B<sub>1</sub>R in VSMC through AT<sub>1</sub> receptor in the early phase and subsequently by activating ET<sub>A</sub> receptor through the release of ET-1. These results also highlight the primary role of oxidative stress in the induction and overexpression of B<sub>1</sub>R by ANG II and ET-1 in VSMC and the implication of PI3kinase and NF- $\kappa$ B in ANG II-induced expression of B<sub>1</sub>R. From these data, it can be suggested that the deleterious effects of ANG II and ET-1 in vascular disorders associated to diabetes, hypertension and atherosclerosis may be mediated through the upregulation of B<sub>1</sub>R. Hence, this study supports the concept that B<sub>1</sub>R antagonists may offer new therapeutic avenues in the treatment of these cardiovascular diseases.

**Acknowledgements**

This work was supported by grants MOP-79471 and MOP-53074 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Marielle Morand-Contant holds Studentship Awards from the Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament (GRUM)-Sanofi-Aventis and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

## Reference List

1. **Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT and Saltiel AR.** PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270: 27489-27494, 1995.
2. **Anand-Srivastava MB, de Champlain J. and Thibault C.** DOCA-salt hypertensive rat hearts exhibit altered expression of G-proteins. *Am J Hypertens* 6: 72-75, 1993.
3. **Anand-Srivastava MB, Franks DJ, Cantin M and Genest J.** Presence of "Ra" and "P"-site receptors for adenosine coupled to adenylate cyclase in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 108: 213-219, 1982.
4. **Arejian M, Li Y and Anand-Srivastava MB.** Nitric oxide attenuates the expression of natriuretic peptide receptor C and associated adenylyl cyclase signaling in aortic vascular smooth muscle cells: role of MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H1859-H1867, 2009.
5. **Ceravolo GS, Fernandes L, Munhoz CD, Fernandes DC, Tostes RC, Laurindo FR, Scavone C, Fortes ZB and Carvalho MH.** Angiotensin II chronic infusion induces B1 receptor expression in aorta of rats. *Hypertension* 50: 756-761, 2007.
6. **Christopher J, Velarde V and Jaffa AA.** Induction of B(1)-kinin receptors in vascular smooth muscle cells: cellular mechanisms of map kinase activation. *Hypertension* 38: 602-605, 2001.

7. **Couture R and Girolami JP.** Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 500: 467-485, 2004.
8. **Descorbeth M and Anand-Srivastava MB.** High glucose increases the expression of Gq/11alpha and PLC-beta proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H2135-H2142, 2008.
9. **Fernandes L, Ceravolo GS, Fortes ZB, Tostes R, Santos RA, Santos JA, Mori MA, Pesquero JB and de Carvalho MH.** Modulation of kinin B1 receptor expression by endogenous angiotensin II in hypertensive rats. *Regul Pept* 136: 92-97, 2006.
10. **Goldstein RH and Wall M.** Activation of protein formation and cell division by bradykinin and des-Arg9-bradykinin. *J Biol Chem* 259: 9263-9268, 1984.
11. **Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y and Bühler FR.** Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul* 1: 649-659, 1990.
12. **Hashim S, Li Y and Anand-Srivastava MB.** Small cytoplasmic domain peptides of natriuretic peptide receptor-C attenuate cell proliferation through G1alpha protein/MAP kinase/PI3-kinase/AKT pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H3144-H3153, 2006.
13. **Hashim S, Liu YY, Wang R and Anand-Srivastava MB.** Streptozotocin-induced diabetes impairs G-protein linked signal transduction in vascular smooth muscle. *Mol Cell Biochem* 240: 57-65, 2002.

14. **Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG and Cheng TH.** Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 61: 159-168, 2004.
15. **Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S, Fukami T, Ishikawa K, Nishikibe M and Yano M.** Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci* 50: 247-255, 1992.
16. **Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mino N, Saeki T, Fukuroda T, Fukami T, Ozaki S, Nagase T, Nishikibe M. and Yano M.** Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4892-4896, 1994.
17. **Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beauséjour CM and Couture R.** Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur J Pharmacol* 589: 66-72, 2008.
18. **Jiang B, Xu S, Brecher P and Cohen RA.** Growth factors enhance interleukin-1 beta-induced persistent activation of nuclear factor-kappa B in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1811-1816, 2002.
19. **Kang YJ, Kim HS and Choi HC.** Troglitazone increases IL-1beta induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression via enhanced phosphorylation of IkappaBalpha in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 31: 1955-1958, 2008.
20. **Kimes BW and Brandt BL.** Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp Cell Res* 98: 349-366, 1976.

21. **Kintsurashvili E, Duka I, Gavras I, Johns C, Farmakiotis D and Gavras H.** Effects of ANG II on bradykinin receptor gene expression in cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1778-H1783, 2001.
22. **Laplane MA, Wu R, Moreau P and de Champlain J.** Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats. *Free Radic Biol Med* 38: 589-596, 2005.
23. **Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ and Zuraw BL.** International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57: 27-77, 2005.
24. **Li Y, Lappas G and Anand-Srivastava MB.** Role of oxidative stress in angiotensin II-induced enhanced expression of Gi(alpha) proteins and adenylyl cyclase signaling in A10 vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1922-H1930, 2007.
25. **Livak KJ and Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
26. **Marceau F, Hess JF and Bachvarov DR.** The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 50: 357-386, 1998.

27. **McLean PG, Perretti M and Ahluwalia A.** Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc Res* 48: 194-210, 2000.
28. **Mehta PK and Griendling KK.** Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C82-C97, 2007.
29. **O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT and England PJ.** Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J* 290 ( Pt 1): 41-49, 1993.
30. **Petcu M, Ongali B, El Midaoui A., de Champlain J. and Couture R.** Effects of alpha-lipoic acid on kinin B1 and B2 receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. *Peptides* 26: 1331-1338, 2005.
31. **Pinet F.** [What is the role of endothelin system?]. *Med Sci (Paris)* 20: 339-345, 2004.
32. **Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK and Harrison DG.** Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97: 1916-1923, 1996.
33. **Regoli D and Barabé J.** Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 32: 1-46, 1980.
34. **Remuzzi G, Perico N and Benigni A.** New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. *Nat Rev Drug Discov* 1: 986-1001, 2002.



35. **Saward L and Zahradka P.** Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 81: 249-257, 1997.
36. **Schiffrin EL.** Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 43: 19-29, 2005.
37. **Siragy HM and Carey RM.** The subtype-2 (AT<sub>2</sub>) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT<sub>1</sub> receptor-mediated prostaglandin E<sub>2</sub> production in conscious rats. *J Clin Invest* 97: 1978-1982, 1996.
38. **Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA and Smith RD.** Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 45: 205-251, 1993.
39. **Touyz RM and Schiffrin EL.** Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52: 639-672, 2000.
40. **Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F and Schiffrin EL.** Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 22: 1141-1149, 2004.
41. **Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD and Panayotou G.** Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol* 16: 1722-1733, 1996.

42. **Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J and Ahmad M.** Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60: 6-20, 2003.
43. **Zhuo J, Moeller I, Jenkins T, Chai SY, Allen AM, Ohishi M and Mendelsohn FA.** Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *J Hypertens* 16: 2027-2037, 1998.

### Figure legends

**Fig. 1. Upregulation expression of B<sub>1</sub>R by ANG II at protein level.** *Concentration-response curve:* A10 (A) and aortic (B) VSMC were stimulated by different concentrations (1 nM to 10  $\mu$ M) of ANG II for 6 h. Results are expressed as percentage of control (CTL) taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of 6 and 3 separate experiments, respectively, \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 vs CTL. *Time-course response curve:* A10 (C) and aortic (D) VSMC were incubated in the presence of ANG II (1  $\mu$ M) for 1 to 24 h. Results are expressed as percentage of baseline (CTL) taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of 7 and 5 separate experiments, respectively, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 vs CTL.

**Fig. 2. Upregulation of B<sub>1</sub>R by ANG II at mRNA level.** VSMC A10 were incubated in the presence of ANG II (1  $\mu$ M) for 1 to 24 h. Values of B<sub>1</sub>R mRNA/18S are expressed as fold change when compared to the baseline (CTL) taken as 1. Values are means  $\pm$  SEM of 6 separate experiments performed in duplicate, \*P < 0.05 vs CTL.

**Fig. 3. Effect of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptor antagonists on ANG II-induced increase expression of B<sub>1</sub>R.** VSMC A10 were pretreated without (CTL) or with losartan (10  $\mu$ M) or PD123319 (10  $\mu$ M) overnight and challenged with ANG II (1  $\mu$ M) for 6 h. Results are expressed as percentage of CTL taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of 3 separate experiments, \*\*P < 0.01 vs CTL; ††P < 0.01 vs ANG II.

**Fig. 4. Effect of ERK1/2 and PI3kinase inhibitors on ANG II-induced increase expression of B<sub>1</sub>R.** VSMC A10 were pretreated without (CTL) or with PD098059 (10  $\mu$ M) or Wortmannin (100 nM) overnight and challenged with ANG II (1  $\mu$ M) for 6 h. Results are expressed as percentage of CTL taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of 4 separate experiments, \*\*\*P < 0.001 vs CTL; ††P < 0.01 vs ANG II.

**Fig. 5. Effect of NF- $\kappa$ B inhibitor on ANG II and IL-1 $\beta$ -induced increase expression of B<sub>1</sub>R.** VSMC A10 were pretreated without (CTL) or with MG132 (10  $\mu$ M) for 30 min and challenged with ANG II (1  $\mu$ M) or IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) for 6 h. Results are expressed as percentage of CTL taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of 3 separate experiments, \*\*\*P < 0.001 vs CTL; ††P < 0.01 vs ANG II, †P < 0.05 vs IL-1 $\beta$ .

**Fig. 6. Effect of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor antagonists on ANG II-induced increase expression of B<sub>1</sub>R.** VSMC A10 were pretreated without (CTL) or with BQ123 (1  $\mu$ M) or BQ788 (1  $\mu$ M) overnight and challenged with ANG II (1  $\mu$ M) for 6 h. Results are expressed as percentage of CTL taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of 5 separate experiments, \*\*\*P < 0.001 vs CTL; †††P < 0.001 vs ANG II.

**Fig. 7. Effect of ET<sub>A</sub> receptor antagonist on ANG II-induced time-dependent expression of B<sub>1</sub>R.** VSMC A10 were pretreated or not with BQ123 (1  $\mu$ M) overnight and challenged with ANG II (1  $\mu$ M) for different periods (1 to 8 h). Results are expressed as percentage of baseline (CTL) taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of 6 separate

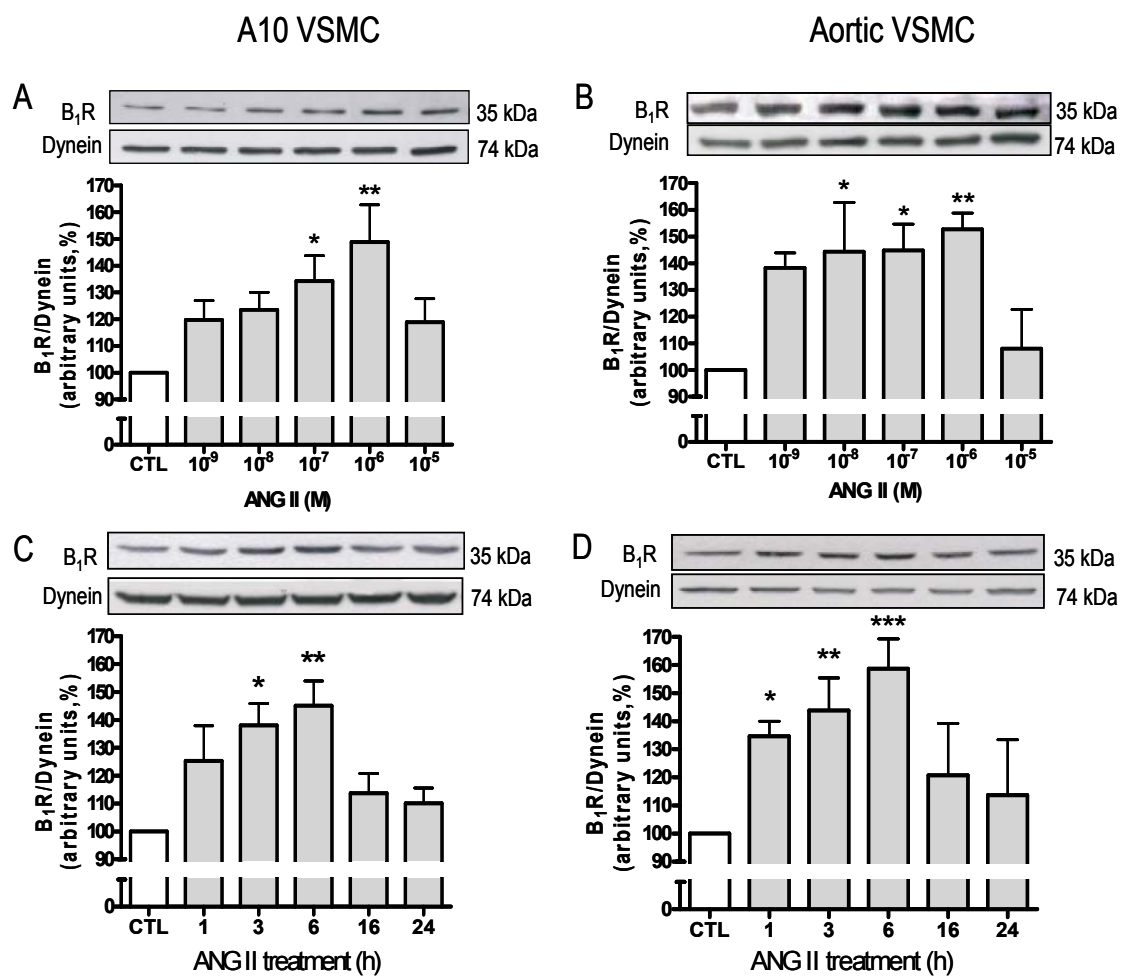
experiments, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 vs CTL; †P < 0.05 and †††P < 0.001 vs ANG II.

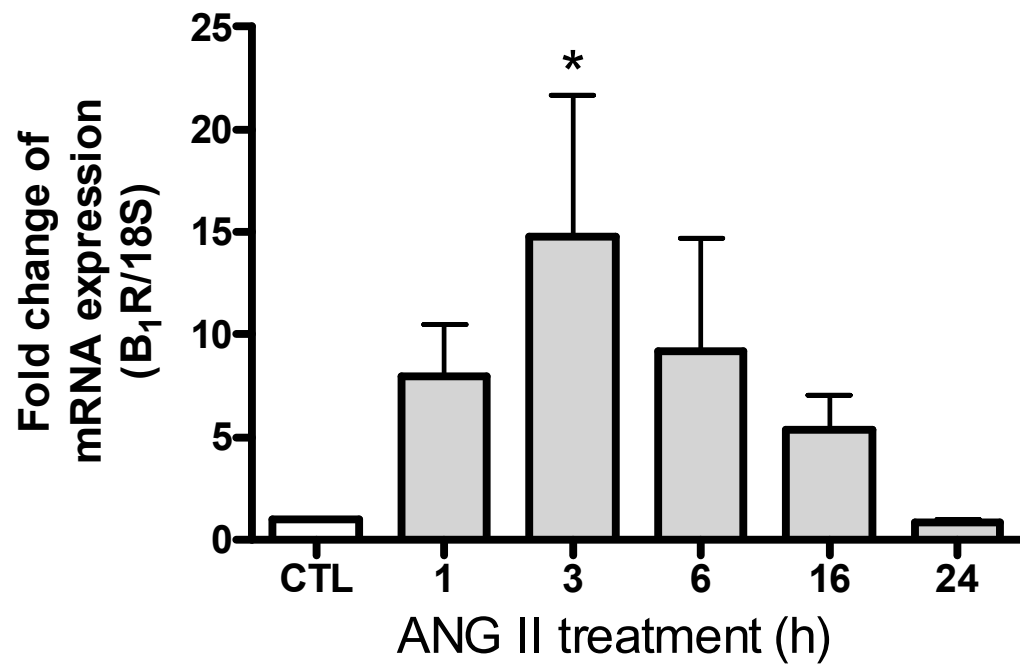
**Fig. 8. Upregulation expression of B<sub>1</sub>R by ET-1 at protein level.** A10 (A) and aortic (B) VSMC were incubated in the presence of ET-1 (100 nM) for 1 to 6 h. Results are expressed as percentage of baseline (CTL) taken as 100%. Values are means ± SEM of 4 and 5 separate experiments, respectively, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 vs CTL.

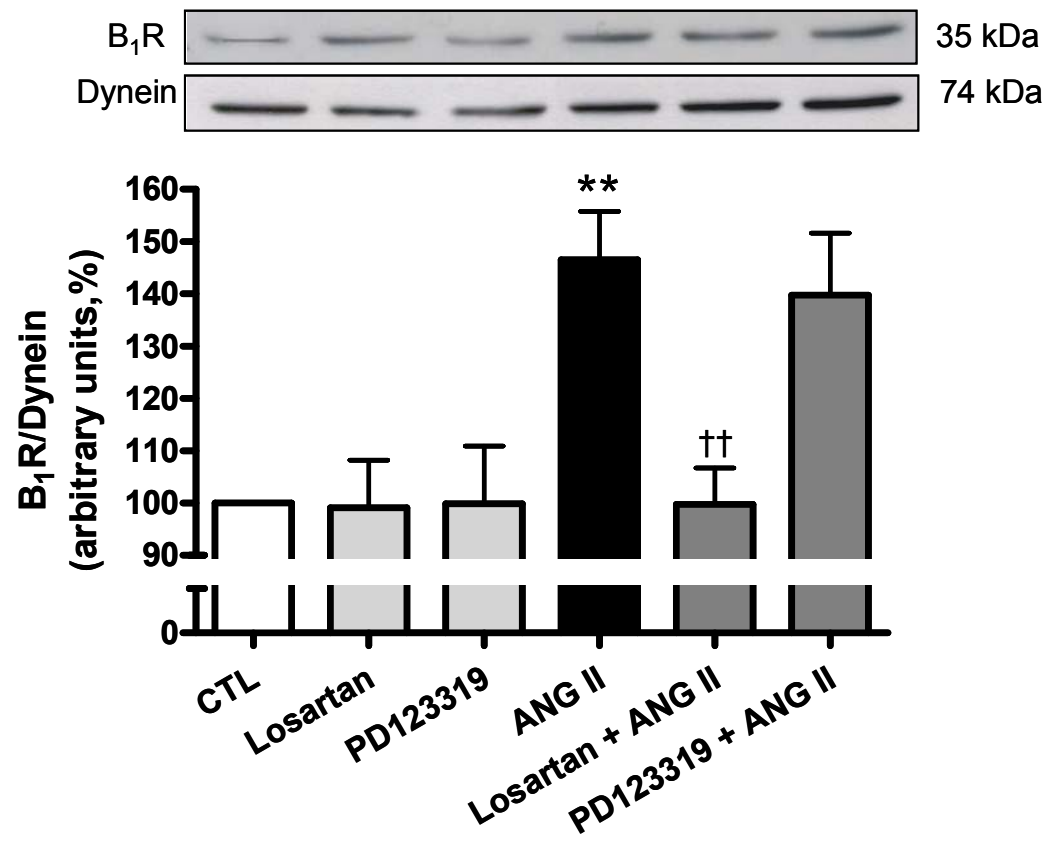
**Fig. 9. Effect of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor antagonists on ET-1-induced increase expression of B<sub>1</sub>R.** VSMC A10 were pretreated without (CTL) or with BQ123 (1 μM) or BQ788 (1 μM) overnight and challenged with ET-1 (100 nM) for 2 h. Results are expressed as percentage of CTL taken as 100%. Values are means ± SEM of 4 separate experiments, \*\*\*P < 0.001 vs CTL; †††P < 0.001 vs ET-1.

**Fig. 10. Effect of antioxidants on ANG II and ET-1-induced increase expression of B<sub>1</sub>R.** VSMC A10 were pretreated without (CTL) or with NAC (2 mM) or DPI (10 μM) overnight and challenged with ANG II (1 μM) for 6 h (A) or ET-1 (100 nM) for 2 h (B). Results are expressed as percentage of CTL taken as 100%. Values are means ± SEM of 4 separate experiments for both vasopeptides, \*\*P < 0.01 vs CTL; ††P < 0.01 vs ET-1 or ANG II.

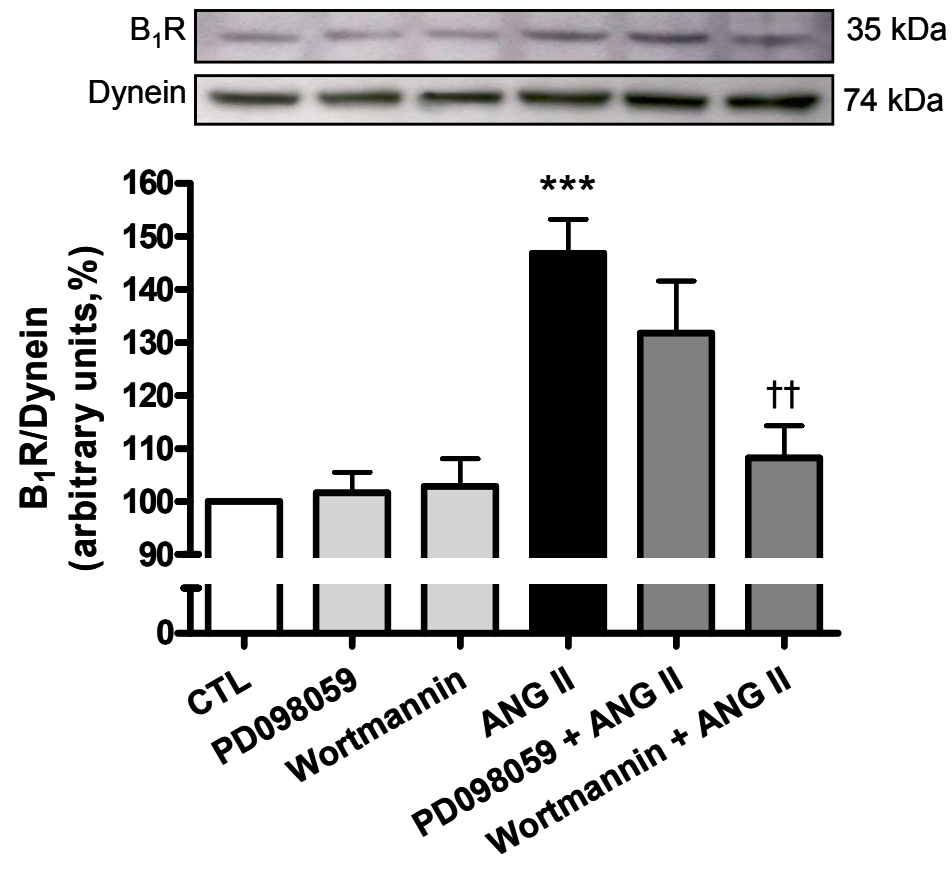
Figure 1

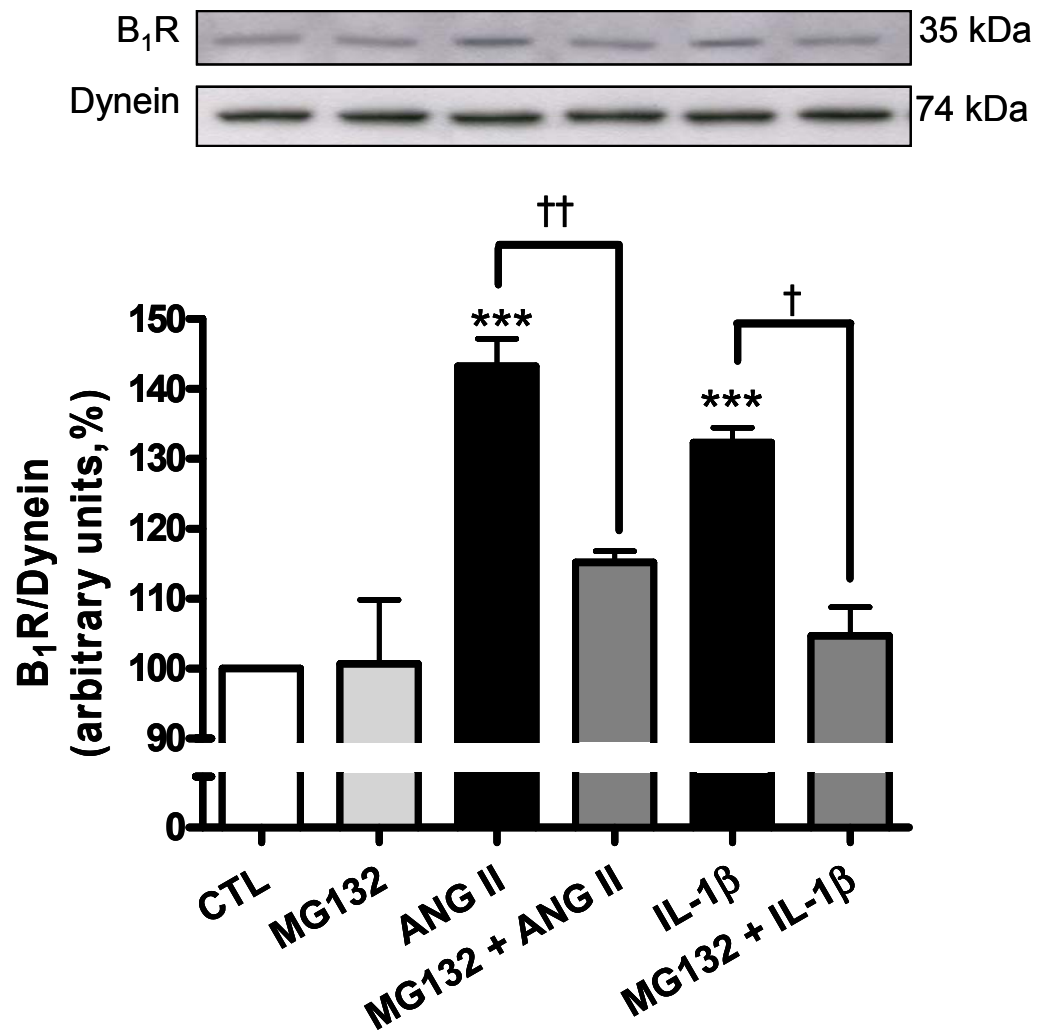


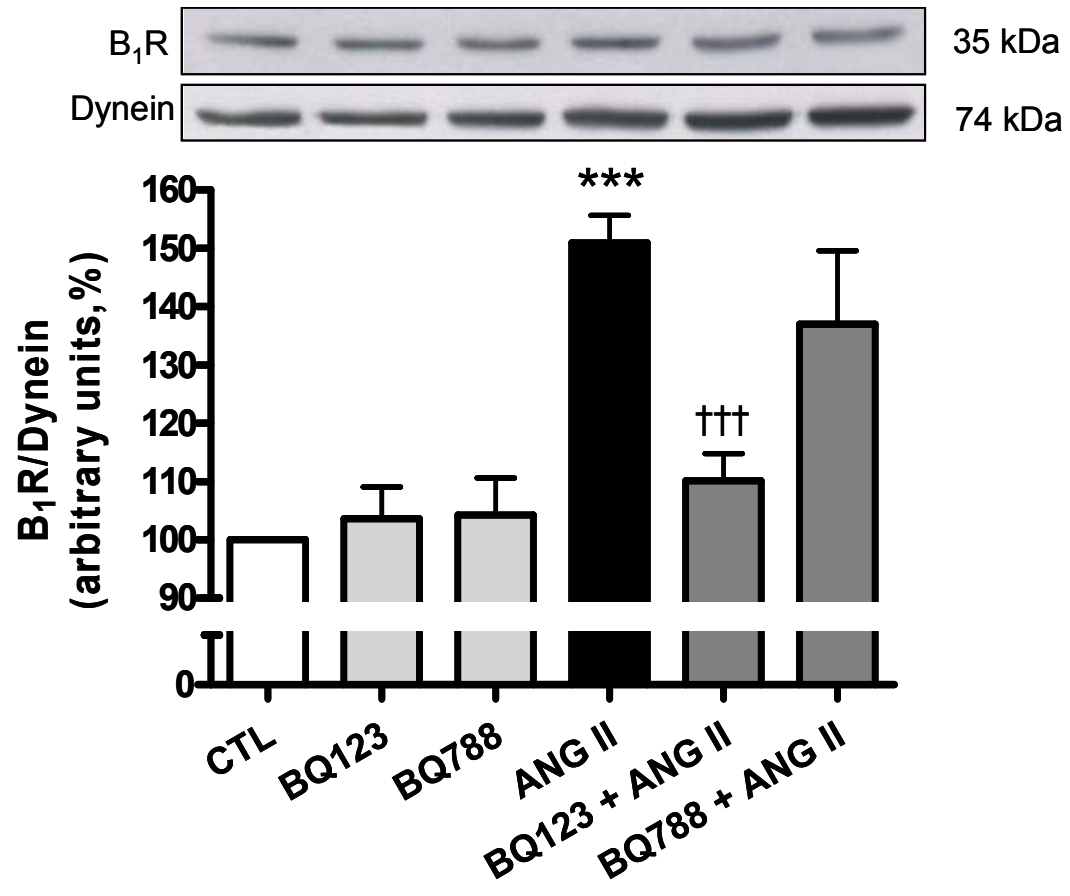
*Figure 2*

*Figure 3*



*Figure 4*

*Figure 5*

*Figure 6*

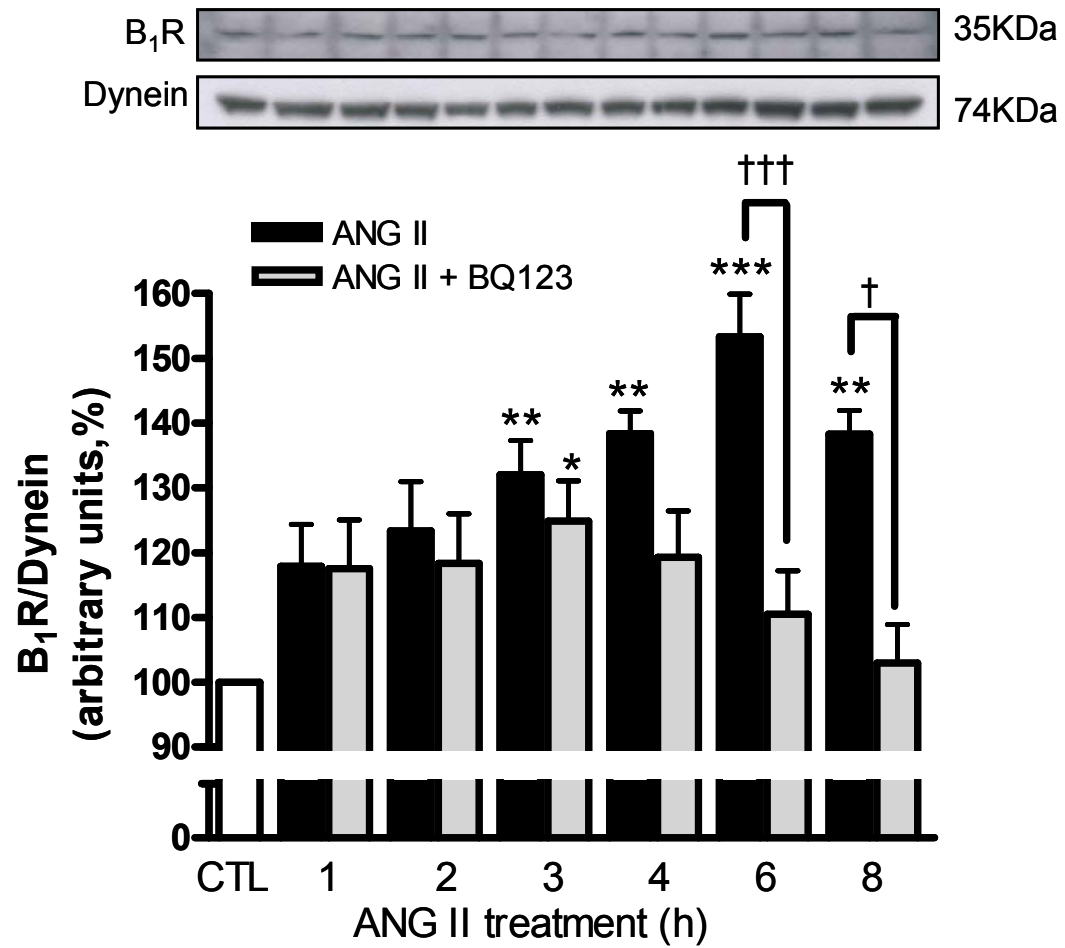
*Figure 7*

Figure 8

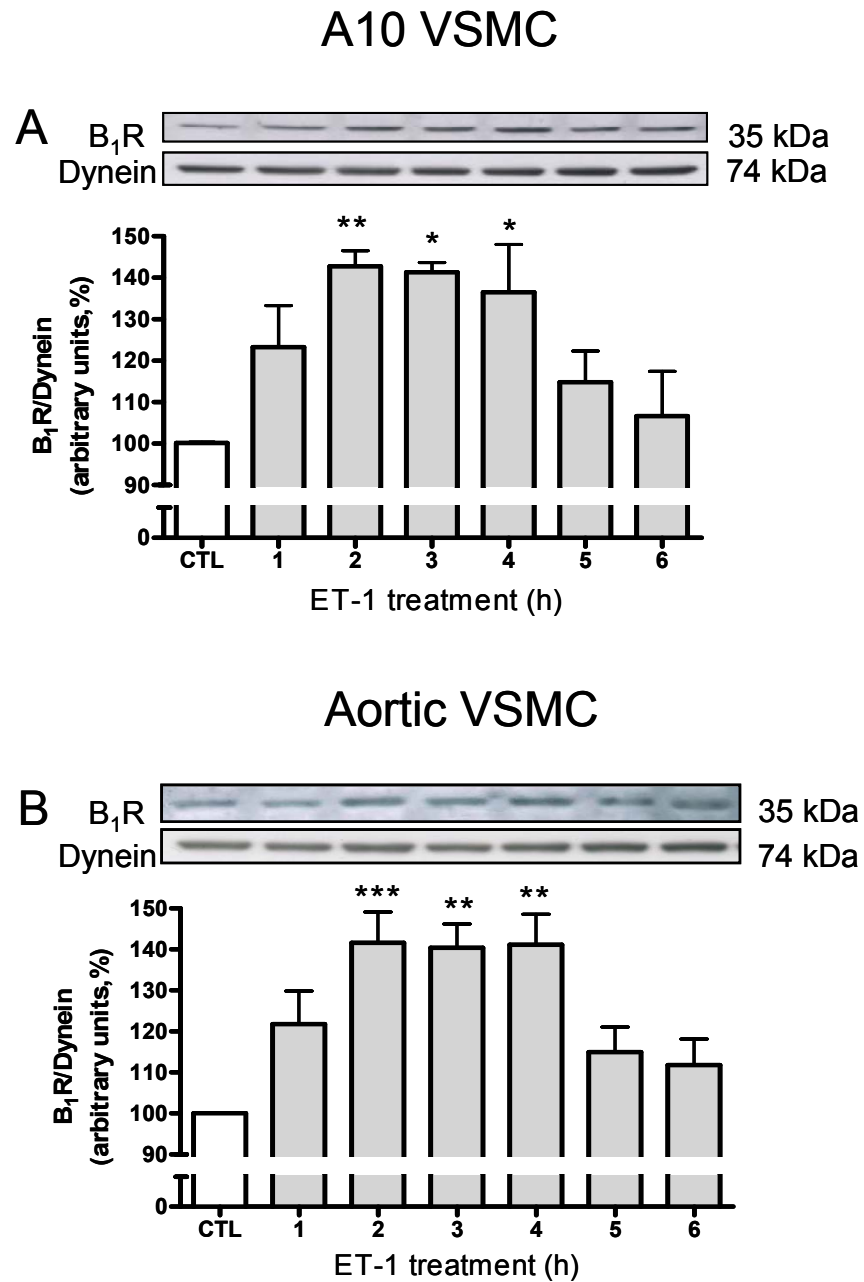


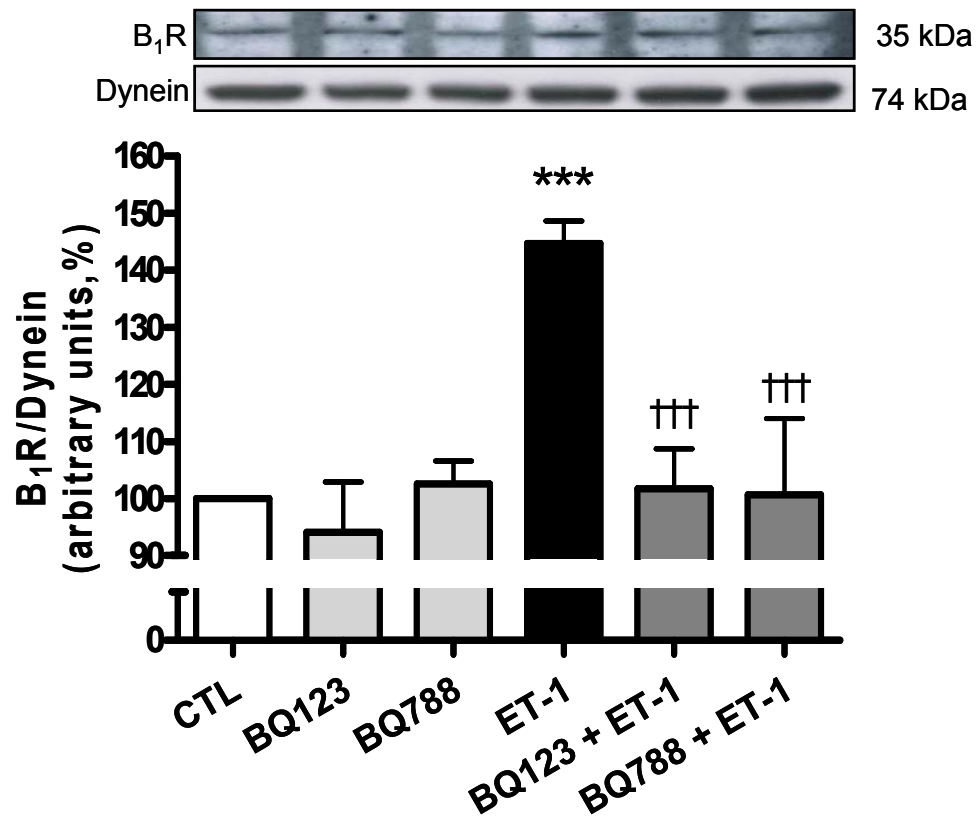
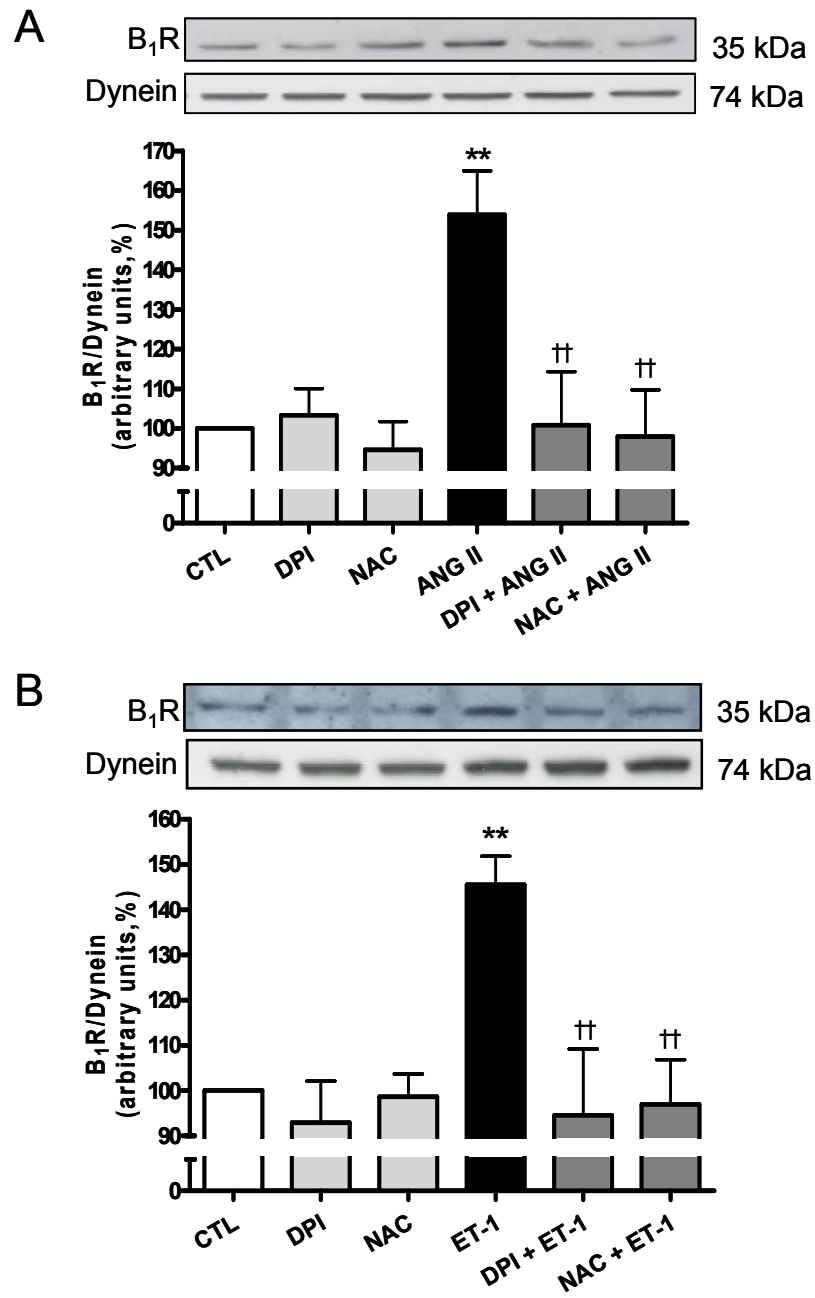
Figure 9

Figure 10



## **CHAPITRE 3 – DISCUSSION ET CONCLUSION**



## 6. Discussion

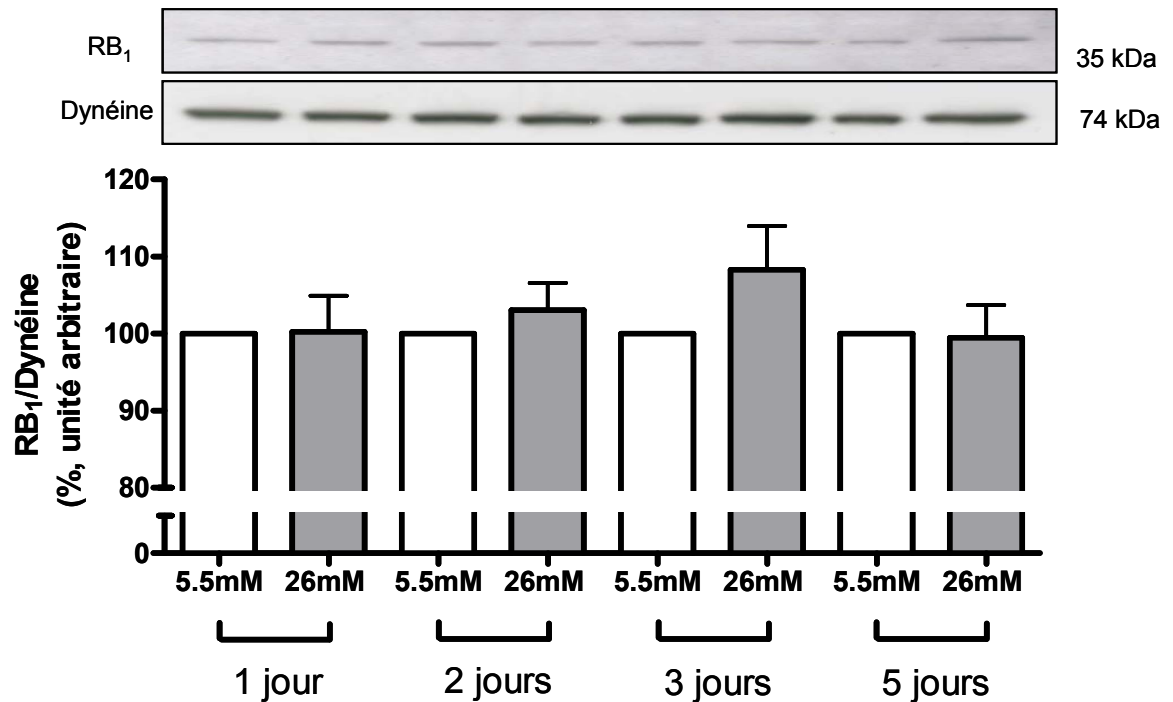
Dans cette étude, nous avons montré que les vasopeptides Ang II et ET-1 exercent un effet significatif sur l'expression protéique du RB<sub>1</sub> dans les CMLV de deux souches cellulaires, la lignée A10 et des CMLV fraîchement dérivées de l'aorte thoracique de rat Sprague-Dawley. Aussi, l'Ang II augmente le niveau d'ARNm du RB<sub>1</sub> dans la lignée cellulaire A10. L'effet de l'Ang II sur l'expression du RB<sub>1</sub> comporte deux phases : une première phase impliquant l'activation du récepteur AT<sub>1</sub> et une deuxième phase associée à l'activation tardive du récepteur ET<sub>A</sub> par l'ET-1 libérée sous l'action de l'Ang II. De son côté, l'ET-1 exogène augmente l'expression du RB<sub>1</sub> par l'intermédiaire des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> et par le stress oxydatif. L'augmentation de l'expression du RB<sub>1</sub> en réponse à l'Ang II semble impliquer le stress oxydatif, la voie de la PI3K et le NF-κB.

Puisque l'implication du récepteur ET<sub>B</sub> dans l'augmentation du RB<sub>1</sub> semble différer si la stimulation est faite avec l'Ang II ou avec l'ET-1, nous avons testé un agoniste sélectif du récepteur ET<sub>B</sub> (Takai et al., 1992) sur les cellules A10 : le IRL-1620 (100 nM, 2 h). Nos résultats ont montré une augmentation significative du RB<sub>1</sub> avec l'IRL-1620 ( $122,6 \pm 4,8 \%$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0,01$  Student's t-test), quoique moindre que celle induite par l'ET-1 à une concentration similaire ( $142,7 \pm 4,6 \%$ ,  $n = 4$ ,  $P < 0,01$  One-way ANOVA suivit d'un test de Dunnett à comparaison multiple). Ainsi, cette expérience est en faveur de l'implication partielle du récepteur ET<sub>B</sub> dans l'augmentation de l'expression du RB<sub>1</sub>. Par conséquent, l'augmentation de l'expression protéique du RB<sub>1</sub> par l'ET-1 est probablement relayée par les récepteurs ET<sub>A</sub> et, à un moindre degré, par ET<sub>B</sub>. Les concentrations d'ET-1 endogènes peuvent ne pas atteindre les concentrations nécessaires pour activer le récepteur ET<sub>B</sub> lors de la stimulation avec l'Ang II. Cette interprétation demeure à être prouvée par la mesure des taux d'ET-1 libérés et par la détermination des concentrations nécessaires pour activer chacun des deux récepteurs.

Du côté des MAPK, notre étude montre que ERK1/2 ne semble pas être nécessaire pour l'augmentation de l'expression du RB<sub>1</sub> après 6 heures de stimulation par l'Ang II

puisque PD098059 n'a pas eu d'effet inhibiteur sur l'augmentation du RB<sub>1</sub> provoquée par l'Ang II. Par contre, il est connu que, dans les CMLV, l'Ang II peut activer par l'intermédiaire du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> une autre voie des MAPK, celle de la p38 (Mehta et Griendling, 2007). Cette p38 joue un rôle important dans l'activation d'Akt et dans la synthèse des protéines provoquées par l'Ang II (Mehta et Griendling, 2007). Ainsi, l'importance de la p38 dans l'augmentation du RB<sub>1</sub> n'est pas à négliger, et on peut penser que la p38 est plus impliquée dans l'augmentation du RB<sub>1</sub> comparativement à ERK1/2, comme il a été démontré dans l'anneau d'aorte de lapin (Larrivée et al., 1998).

Lorsque notre étude a été entreprise, une expérience qui nous semblait très prometteuse était la stimulation des CMLV avec une forte concentration de glucose. Puisque les taux circulants d'ET-1 et d'Ang II sont augmentés dans le diabète et l'hyperglycémie (Collier et al., 1992; Keynan et al., 2004; Lavrentyev et al., 2007; Lewis et al., 1993; Saito et al., 1996), il est donc possible que ces vasopectides contribuent à l'augmentation de l'expression du RB<sub>1</sub> dans ces pathologies. De plus, sachant que le stress oxydatif est associé aux complications cardiovasculaires observées dans le diabète et dans l'hyperglycémie (Baynes et Thorpe, 1999), il semblait très probable que, dans ces conditions, l'expression du RB<sub>1</sub> soit augmentée. Avec plus d'une dizaine d'expériences dans nos deux types de CMLV (lignée A10 et CMLV dérivées de l'aorte de rat Sprague-Dawley) exposées à 26 mM de glucose avec ou sans la présence d'insuline (100 nM) pendant différentes périodes d'exposition variant de 1 à 5 jours, aucune variation significative de l'expression du RB<sub>1</sub> n'a été observée (figure 15). Il se peut donc que les conditions expérimentales *in vitro* ne soient pas satisfaisantes pour induire le stress oxydatif ou permettre la libération d'Ang II et d'ET-1 en présence d'hyperglycémie. Ces expériences demandent donc à être validées par la mesure concomitante de la production du stress oxydatif (ex. : mesure de l'anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, peroxynitrite...) et des niveaux endogènes des vasopectides mentionnés.



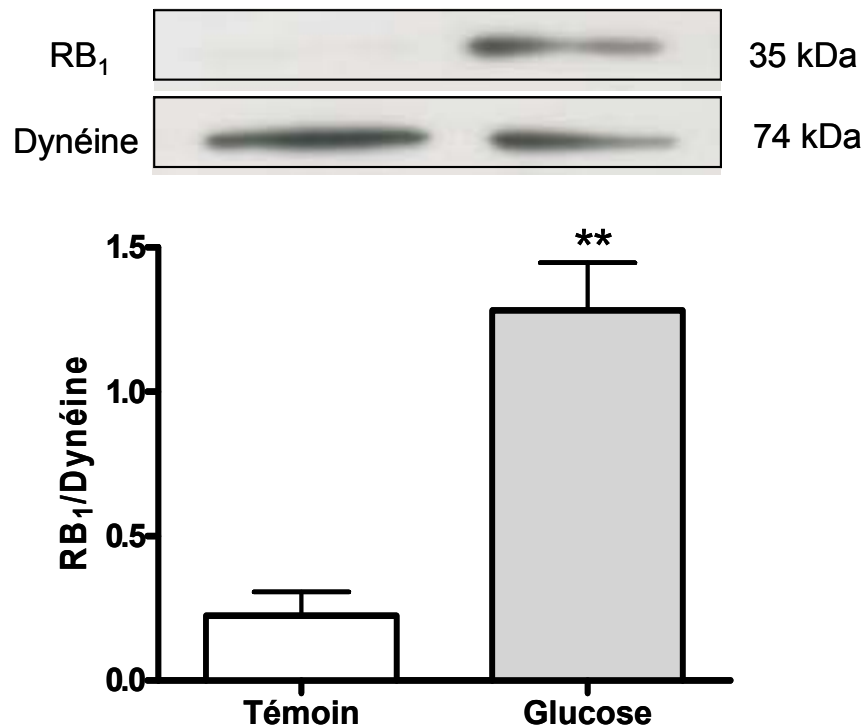
**Figure 15: Expression du récepteur B<sub>1</sub> des kinines dans des CMLV exposées à une concentration de 26 mM de glucose pendant 1 à 5 jours.**

Les CMLV A10 ont été prétraitées avec une concentration normale (5,5 mM) ou élevée (26 mM) de glucose pendant 1 à 5 jours. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au 5,5 mM de glucose (100%) pour chacun des temps d'incubation. Les valeurs sont exprimées par la moyenne  $\pm$  écart-type de 15 expériences indépendantes.

Les modèles cellulaires que nous avons utilisés dans cette étude sont des CMLV fraîchement dérivées de l'aorte thoracique de rat Sprague-Dawley adulte et des CMLV A10 dérivées d'aorte thoracique de rat embryonnaire. L'avantage de travailler avec les cellules A10 est qu'elles sont disponibles commercialement et qu'elles peuvent être cultivées pendant une longue période de temps sans changer de phénotype (Kimes et Brandt, 1976). De plus, il a été montré par des études de liaison avec des radioligands que les cellules A10 peuvent exprimer les récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines à leur surface membranaire (Yau, Pinsk, et Zahradka, 1996). Ces récepteurs sont fonctionnels tel qu'observé en examinant la production de prostaglandines lors de stimulation avec un agoniste et la diminution de la

synthèse d'ARN ribosomique lors de l'utilisation d'antagonistes sélectifs aux récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines (Yau et al., 1996). Ainsi, les cellules A10 sont tout à fait représentatives des CMLV *ex vivo* fraîchement isolées. Notre étude montre des réponses similaires à l'Ang II et à l'ET-1 sur les deux types cellulaires, confirmant le modèle des cellules A10 pour les études ultérieures portant sur la signalisation intracellulaire du RB<sub>1</sub> des kinines.

Par contre, l'étude du RB<sub>1</sub> qui s'exprime dans des conditions pathologiques ou lors d'un stress est très difficile à exécuter dans un milieu de culture *in vitro*. Le simple fait de cultiver les cellules à l'extérieur de l'organisme engendre un stress mécanique et biochimique pour les cellules et peut expliquer la présence du RB<sub>1</sub> dans l'expérience témoin alors qu'il est normalement absent *in vivo*. De plus, l'ajout de facteurs de croissance (sérum de veau fœtal) dans le milieu de culture (afin de faire croître les cellules pour atteindre une certaine confluence) affecte possiblement l'expression du RB<sub>1</sub> qui est sensible à ces agents mitogéniques comme le EGF (Larrivée et al., 1998). La proportion de RB<sub>1</sub> retrouvée sur ces cellules témoins en culture n'est donc pas tout à fait représentative de l'abondance naturellement retrouvée chez un individu sain et peut conduire à une sous-estimation des effets de l'Ang II et de l'ET-1 sur l'augmentation de l'expression (protéique et ARNm) du RB<sub>1</sub>. Si nous avions pu obtenir un nombre assez élevé de cellules fraîches provenant directement de l'aorte de rat sans avoir été cultivées, peut-être aurions-nous eu des augmentations plus grandes que 150 % sur l'expression du RB<sub>1</sub> par rapport aux cellules contrôles. En effet, nous avons observé sur l'aorte complète de rat traité au glucose pendant 8 semaines une augmentation de RB<sub>1</sub> (environ 500 %), comparativement au rat témoin (données non publiées) (figure 16).



**Figure 16: Expression protéique du RB<sub>1</sub> dans l'aorte de rat traité avec 10 % de glucose dans l'eau à boire.**

Les rats Sprague-Dawley ont été traités pendant 8 semaines avec 10 % de glucose dans l'eau à boire et les aortes ont été récoltées. Les valeurs sont exprimées par une moyenne du rapport de l'expression du RB<sub>1</sub>/Dynéine  $\pm$  écart-type. \*\*P < 0,01 avec le Student's t-test pour n = 4.

Évidemment, l'absence de cellules endothéliales déroge de la situation *in vivo* et fait en sorte que notre modèle de CMLV en culture n'est pas complètement représentatif d'un vaisseau sanguin. La contribution des médiateurs vasoactifs habituellement relâchés par l'endothélium (NO, PGI<sub>2</sub>, BK, EDHF) ne peut pas être appréciée dans les CMLV isolées. Aussi, l'Ang II circulante peut favoriser la relâche d'ET-1 produite par les cellules endothéliales. Les concentrations d'ET-1 et d'Ang II tissulaires et circulantes peuvent exercer un effet plus puissant sur l'augmentation de l'expression du RB<sub>1</sub> en situation *in vivo*. Par contre, le NO produit par les cellules endothéliales peut aussi inhiber la synthèse

et la relâche d'ET-1 (Goto et al., 1996). Sur le plan fonctionnel, l'augmentation de l'expression du RB<sub>1</sub> peut intervenir à la fois sur les CMLV et l'endothélium et ainsi exercer des effets biologiques opposés. Dans le cas d'un dysfonctionnement ou de la perte de l'endothélium comme c'est le cas dans plusieurs maladies cardiovasculaires et lors de l'athérosclérose, le RB<sub>1</sub> exprimé sur les CMLV jouera alors un rôle prédominant. Si l'endothélium n'est pas en mesure d'assurer le rôle vasodilatateur du RB<sub>1</sub>, le RB<sub>1</sub> situé sur les CMLV peut alors favoriser la vasoconstriction, la prolifération cellulaire et l'hypertension artérielle.

## 7. Perspectives

Bien que notre étude permette l'identification de nouveaux joueurs mettant en lumière le mécanisme d'induction du RB<sub>1</sub>, beaucoup de travail reste à faire. Il serait intéressant de vérifier l'implication des facteurs de croissance dans l'augmentation de l'expression du RB<sub>1</sub>. Des études menées par Gomez Sandoval et Anand-Srivastava (2009) ont indiqué l'implication de la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance tels que le récepteur du facteur de croissance épidermique, le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes et le récepteur de facteur de croissance apparenté à l'insuline dans la production endogène d'ET-1 et d'Ang II dans les CMLV de rat spontanément hypertendu. Ainsi, il serait particulièrement intéressant de vérifier la modulation de l'expression du RB<sub>1</sub> dans ce modèle d'hypertension où la stimulation par les vasoptides est endogène et non exogène comme dans notre modèle d'étude. D'autre part, il est possible que l'augmentation de l'expression du RB<sub>1</sub> par l'Ang II et l'ET-1 exogène puisse opérer par la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance, soit par la libération de facteurs de croissance qui activeront directement leur récepteur ou par l'intermédiaire de c-Src, un mécanisme intracellulaire qui ne nécessite pas la synthèse et la relâche de facteur de croissance.

Dans notre étude, la voie des MAPK par ERK1/2 ne semblait pas impliquée dans le mécanisme d'augmentation d'expression du RB<sub>1</sub>. Par contre, d'autres voies mitogéniques existent et pourraient être la cause de l'augmentation de ce récepteur. Par exemple, la voie

de la p38 serait une avenue intéressante à explorer, ainsi que la voie de JNK/SAPK. Finalement, nous avons démontré l'implication de la PI3K, mais nous n'avons pas exploré l'activité et les cibles visées par l'Akt.

Une expérience très prometteuse serait d'essayer de corrélérer temporellement la production d'anion superoxyde ainsi que l'activité de la NAD(P)H oxydase avec l'augmentation de l'expression du RB<sub>1</sub> à la suite de la stimulation avec l'Ang II et l'ET-1. Ainsi, l'implication de la NAD(P)H oxydase comme source principale de stress oxydatif menant à l'augmentation du RB<sub>1</sub> serait supportée par une autre approche que l'usage des traitements avec des antioxydants.

Une facette du projet qui n'a pas été explorée est la fonctionnalité du RB<sub>1</sub> nouvellement exprimé dans les CMLV. Ainsi, une autre expérience pertinente à envisager serait de montrer, en présence d'un agoniste du RB<sub>1</sub>, l'activation de la voie des MAPK (augmentation de la phosphorylation de ERK1/2) ou l'augmentation du calcium intracellulaire par l'intermédiaire de l'IP<sub>3</sub>.

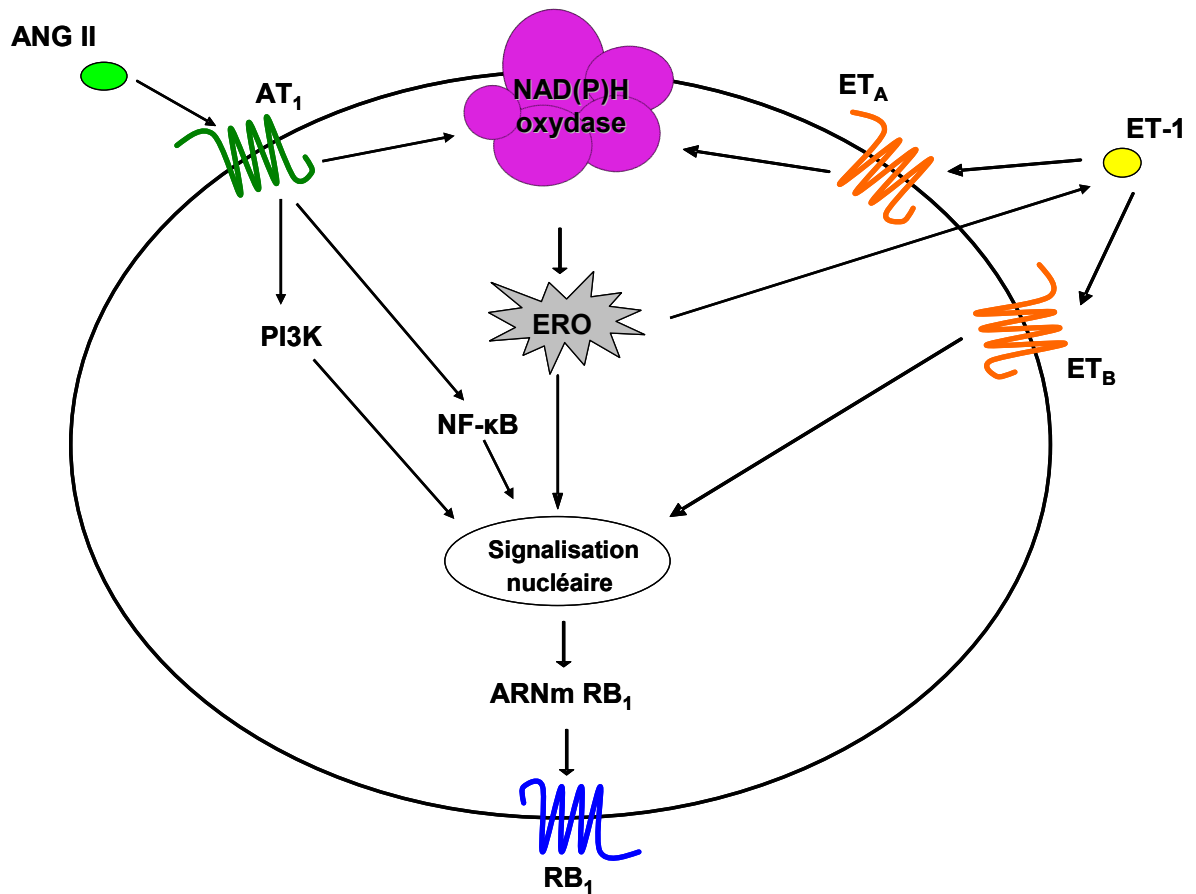
L'Ang II et l'ET-1 sont impliquées dans le remodelage vasculaire et le changement de tonus vasculaire (Remuzzi et al., 2002; Schiffrin, 2005; Touyz et Schiffrin, 2000) observés lors du développement de maladies cardiovasculaires. Le rôle du RB<sub>1</sub> dans ces effets délétères de l'Ang II et de l'ET-1 demeure à être étudié. Ainsi, l'ajout d'expériences *in vivo* effectuées chez le rat infusé à l'Ang II ou à l'ET-1, à l'aide de minipompes, permettrait d'étudier l'augmentation du RB<sub>1</sub> dans plusieurs organes, en plus des CMLV. Des antagonistes sélectifs des récepteurs de l'Ang II, de l'ET-1 et du RB<sub>1</sub> en traitement préventif et curatif pourraient être administrés à l'animal pour évaluer leur impact sur les taux d'expression du RB<sub>1</sub> et les effets biologiques (remodelage vasculaire, apoptose, pression artérielle, stress oxydatif...). De plus, ces effets biologiques pourraient être étudiés en traitant les animaux avec des agonistes sélectifs du RB<sub>1</sub> pour mieux apprécier les effets néfastes de ce récepteur sur l'homéostasie vasculaire. Bref, tout un monde de découvertes reste à être exploré en ce qui a trait aux traitements qui pourraient être utilisés pour prévenir

l'augmentation du  $RB_1$  et diminuer ses effets délétères à la suite de son expression vasculaire *in vivo*.

## 8. Conclusion

Nous avons montré que l'Ang II et l'ET-1 augmentent l'expression du  $RB_1$  dans les CMLV de l'aorte et de la lignée A10. L'Ang II augmente l'expression du  $RB_1$  dans les CMLV par l'intermédiaire du récepteur  $AT_1$  dans la première phase, et ensuite via le récepteur  $ET_A$  par le biais de la libération d'ET-1. De plus, ces résultats mettent en évidence le rôle principal du stress oxydatif dans la surexpression du  $RB_1$  par l'Ang II et l'ET-1 dans les CMLV et de l'implication de la PI3K et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans l'augmentation de l'expression du  $RB_1$  par l'Ang II (figure 17). Ces données suggèrent également que le  $RB_1$  pourrait contribuer aux effets néfastes de l'Ang II et de l'ET-1 dans les maladies vasculaires liées au diabète, à l'hypertension et à l'athérosclérose. Par conséquent, la présente étude soutient l'idée que les antagonistes du  $RB_1$  puissent offrir de nouvelles voies thérapeutiques dans le traitement de ces maladies cardiovasculaires.





**Figure 17. Mécanisme de signalisation suggéré dans l'augmentation du RB<sub>1</sub> des kinines par l'angiotensine II et l'endothéline-1 sur les CMLV.**

**Légende :** ANG II: angiotensine II; PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase; ERO : espèces réactives oxygénées ; NF-κB : facteur de transcription nucléaire kappa B ; ET-1 : endothéline-1 ; RB<sub>1</sub> : récepteur B<sub>1</sub> des kinines.

## 9. Bibliographie

- Abbas, F., Clayton, J. K., Marshall, K. M., et Senior, J. (1998). Characterisation of kinin receptors on the human isolated umbilical artery. *J.Endocrinol.*, 156(2), 389-394.
- Alberts, B. (2004). *Biologie moléculaire de la cellule*. (4<sup>e</sup> éd.). Paris: Flammarion Médecine-Sciences.
- Alexander, R. W., Brock, T. A., Gimbrone, M. A., Jr., et Rittenhouse, S. E. (1985). Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension*, 7(3 Pt 1), 447-451.
- Alfie, M. E., Sigmon, D. H., Pomposiello, S. I., et Carretero, O. A. (1997). Effect of high salt intake in mutant mice lacking bradykinin-B2 receptors. *Hypertension*, 29(1 Pt 2), 483-487.
- Alfie, M. E., Yang, X. P., Hess, F., et Carretero, O. A. (1996). Salt-sensitive hypertension in bradykinin B2 receptor knockout mice. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 224(3), 625-630.
- Anand-Srivastava, M. B. (1983). Angiotensin II receptors negatively coupled to adenylate cyclase in rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun*, 117(2), 420-428.
- Anand-Srivastava, M. B., et Trachte, G. J. (1993). Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol Rev*, 45(4), 455-497.
- Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H., et Nakanishi, S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, 348(6303), 730-732.
- Bachvarov, D. R., Houle, S., Bachvarova, M., Bouthillier, J., Adam, A., et Marceau, F. (2001). Bradykinin B(2) receptor endocytosis, recycling, and down-regulation assessed using green fluorescent protein conjugates. *J Pharmacol Exp Ther*, 297(1), 19-26.
- Bascands, J. L., Pecher, C., Rouaud, S., Emond, C., Tack, J. L., Bastie, M. J., et al. (1993). Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells. *Am.J.Physiol*, 264(3 Pt 2), F548-F556.
- Bathon, J. M., et Proud, D. (1991). Bradykinin antagonists. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 31, 129-162.
- Baynes, J. W., et Thorpe, S. R. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48(1), 1-9.
- Benatti, L., Fabbrini, M. S., et Patrono, C. (1994). Regulation of endothelin-1 biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci*, 714, 109-121.

- Blanc, A., Pandey, N. R., et Srivastava, A. K. (2003). Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease (review). *Int J Mol Med*, 11(2), 229-234.
- Blaukat, A., Alla, S. A., Lohse, M. J., et Muller-Esterl, W. (1996). Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor from human fibroblasts. *J Biol Chem*, 271(50), 32366-32374.
- Blaukat, A., Herzer, K., Schroeder, C., Bachmann, M., Nash, N., et Muller-Esterl, W. (1999). Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtype-specific phosphorylation. *Biochemistry*, 38(4), 1300-1309.
- Blaukat, A., Pizard, A., Breit, A., Wernstedt, C., Alhenc-Gelas, F., Muller-Esterl, W., et al. (2001). Determination of bradykinin B2 receptor in vivo phosphorylation sites and their role in receptor function. *J Biol Chem*, 276(44), 40431-40440.
- Bonnefont-Rousselot, D. (2002). Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 5(5), 561-568.
- Bouallegue, A., Daou, G. B., et Srivastava, A. K. (2007a). Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Curr Vasc Pharmacol*, 5(1), 45-52.
- Bouallegue, A., Daou, G. B., et Srivastava, A. K. (2007b). Nitric oxide attenuates endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 in vascular smooth muscle cells by a cGMP-dependent pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(4), H2072-2079.
- Brock, T. A., Alexander, R. W., Ekstein, L. S., Atkinson, W. J., et Gimbrone, M. A., Jr. (1985). Angiotensin increases cytosolic free calcium in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 7(3 Pt 2), 1105-109.
- Busse, R., et Fleming, I. (1995). Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med*, 27(3), 331-340.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J. P., Ravanat, J. L., et al. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res*, 424(1-2), 9-21.
- Cai, H., Griendling, K. K., et Harrison, D. G. (2003). The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 24(9), 471-478.
- Campbell, N. A., et Reece, J. B. (2007). *Biologie*. (3<sup>e</sup> éd.). St-Laurent, Qué.: ERPI.
- Campos, M. M., Souza, G. E., et Calixto, J. B. (1999). In vivo B1 kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways. *Br.J.Pharmacol.*, 127(8), 1851-1859.
- Cano, E., et Mahadevan, L. C. (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci*, 20(3), 117-122.
- Ceolotto, G., Papparella, I., Lenzini, L., Sartori, M., Mazzoni, M., Iori, E., et al. (2006). Insulin generates free radicals in human fibroblasts ex vivo by a protein kinase C-

- dependent mechanism, which is inhibited by pravastatin. *Free Radic Biol Med*, 41(3), 473-483.
- Ceravolo, G. S., Fernandes, L., Munhoz, C. D., Fernandes, D. C., Tostes, R. C., Laurindo, F. R., et al. (2007). Angiotensin II Chronic Infusion Induces B1 Receptor Expression in Aorta of Rats. *Hypertension*, 50(4), 756-761.
- Chang, L., et Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37-40.
- Chen, X., Touyz, R. M., Park, J. B., et Schiffrin, E. L. (2001). Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension*, 38(3 Pt 2), 606-611.
- Christopher, J., Velarde, V., et Jaffa, A. A. (2001). Induction of B(1)-kinin receptors in vascular smooth muscle cells: cellular mechanisms of map kinase activation. *Hypertension*, 38(3 Pt 2), 602-605.
- Chu, Y., Iida, S., Lund, D. D., Weiss, R. M., DiBona, G. F., Watanabe, Y., et al. (2003). Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of heparin-binding domain. *Circ Res*, 92(4), 461-468.
- Cohen, P. (1997). The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol*, 7(9), 353-361.
- Collier, A., Leach, J. P., McLellan, A., Jardine, A., Morton, J. J., et Small, M. (1992). Plasma endothelinlike immunoreactivity levels in IDDM patients with microalbuminuria. *Diabetes Care*, 15(8), 1038-1040.
- Couture, R., et Girolami, J. P. (2004). Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur.J.Pharmacol.*, 500(1-3), 467-485.
- de Weerd, W. F., et Leeb-Lundberg, L. M. (1997). Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.*, 272(28), 17858-17866.
- Décarie, A., Raymond, P., Gervais, N., Couture, R., et Adam, A. (1996). Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat. *Am.J.Physiol*, 271(4 Pt 2), H1340-H1347.
- Dong, F., Zhang, X., Wold, L. E., Ren, Q., Zhang, Z., et Ren, J. (2005). Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br J Pharmacol*, 145(3), 323-333.
- Drummond, G. R., et Cocks, T. M. (1995a). Endothelium-dependent relaxation to the B1 kinin receptor agonist des-Arg9-bradykinin in human coronary arteries. *Br.J.Pharmacol.*, 116(8), 3083-3085.

- Drummond, G. R., et Cocks, T. M. (1995b). Endothelium-dependent relaxations mediated by inducible B1 and constitutive B2 kinin receptors in the bovine isolated coronary artery. *Br.J.Pharmacol.*, 116(5), 2473-2481.
- Duff, J. L., Marrero, M. B., Paxton, W. G., Schieffer, B., Bernstein, K. E., et Berk, B. C. (1995). Angiotensin II signal transduction and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cardiovasc Res*, 30(4), 511-517.
- Eguchi, S., et Inagami, T. (2000). Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase. *Regul Pept*, 91(1-3), 13-20.
- El Midaoui, A., Elimadi, A., Wu, L., Haddad, P. S., et de Champlain, J. (2003). Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am J Hypertens*, 16(3), 173-179.
- Ellmark, S. H., Dusting, G. J., Fui, M. N., Guzzo-Pernell, N., et Drummond, G. R. (2005). The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res*, 65(2), 495-504.
- Elmarakby, A. A., Morsing, P., et Pollock, D. M. (2003). Enalapril attenuates endothelin-1-induced hypertension via increased kinin survival. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 284(6), H1899-H1903.
- Endoh, M., Fujita, S., Yang, H. T., Talukder, M. A., Maruya, J., et Norota, I. (1998). Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca<sup>2+</sup> transients and contractility in rabbit ventricular myocardium. *Life Sci*, 62(17-18), 1485-1489.
- Enquist, J., Skroder, C., Whistler, J. L., et Leeb-Lundberg, L. M. (2007). Kinins promote B2 receptor endocytosis and delay constitutive B1 receptor endocytosis. *Mol Pharmacol*, 71(2), 494-507.
- Faraci, F. M., et Didion, S. P. (2004). Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(8), 1367-1373.
- Fathy, D. B., Leeb, T., Mathis, S. A., et Leeb-Lundberg, L. M. (1999). Spontaneous human B2 bradykinin receptor activity determines the action of partial agonists as agonists or inverse agonists. Effect of basal desensitization. *J Biol Chem*, 274(42), 29603-29606.
- Feletou, M., et Vanhoutte, P. M. (2007). Endothelium-dependent hyperpolarizations: past beliefs and present facts. *Ann Med*, 39(7), 495-516.
- Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 53(1), 1-24.
- Fernandes, L., Ceravolo, G. S., Fortes, Z. B., Tostes, R., Santos, R. A., Santos, J. A., et al. (2006). Modulation of kinin B1 receptor expression by endogenous angiotensin II in hypertensive rats. *Regul.Pept.*, 136(1-3), 92-97.
- Finkel, T. (1999). Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J Leukoc Biol*, 65(3), 337-340.

- Fortin, J. P., Bouthillier, J., et Marceau, F. (2003). High agonist-independent clearance of rabbit kinin B1 receptors in cultured cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284(5), H1647-1654.
- Funakoshi, Y., Ichiki, T., Takeda, K., Tokuno, T., Iino, N., et Takeshita, A. (2002). Critical role of cAMP-response element-binding protein for angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.*, 277(21), 18710-18717.
- Gabra, B. H., Couture, R., et Sirois, P. (2003). [Functional duality of kinin receptors in pathophysiology]. *Med.Sci.(Paris)*, 19(11), 1101-1110.
- Garg, A., et Aggarwal, B. B. (2002). Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia*, 16(6), 1053-1068.
- Geisterfer, A. A., Peach, M. J., et Owens, G. K. (1988). Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res*, 62(4), 749-756.
- Gobeil, F., Pheng, L. H., Badini, I., Nguyen-Le, X. K., Pizard, A., Rizzi, A., et al. (1996). Receptors for kinins in the human isolated umbilical vein. *Br.J.Pharmacol.*, 118(2), 289-294.
- Goldstein, R. H., et Wall, M. (1984). Activation of protein formation and cell division by bradykinin and des-Arg9-bradykinin. *J.Biol.Chem.*, 259(14), 9263-9268.
- Gomez Sandoval, Y. H., et Anand-Srivastava, M. (2009). Implication des récepteurs aux facteurs de croissance dans la surexpression de  $\text{G}_{i\alpha}$  induite par les peptides vasoactifs chez le SHR (pp. 15): *Médecine Science*.
- Gorlach, C., Benyo, Z., et Wahl, M. (1998). Endothelin-1-induced contraction in cerebral vessels mediated by phospholipase C/protein kinase C cascade. *Kidney Int Suppl*, 67, S224-225.
- Goto, K., Hama, H., et Kasuya, Y. (1996). Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn J Pharmacol*, 72(4), 261-290.
- Gragasin, F. S., Xu, Y., Arenas, I. A., Kainth, N., et Davidge, S. T. (2003). Estrogen reduces angiotensin II-induced nitric oxide synthase and NAD(P)H oxidase expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(1), 38-44.
- Greene, E. L., Velarde, V., et Jaffa, A. A. (2000). Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. *Hypertension*, 35(4), 942-947.
- Griendling, K. K., Rittenhouse, S. E., Brock, T. A., Ekstein, L. S., Gimbrone, M. A., Jr., et Alexander, R. W. (1986). Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 261(13), 5901-5906.
- Griendling, K. K., Sorescu, D., et Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 86(5), 494-501.

- Griendling, K. K., Tsuda, T., Berk, B. C., et Alexander, R. W. (1989). Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*, 14 Suppl 6, S27-33.
- Gryglewski, R. J., Uracz, W., Chlopicki, S., et Marcinkiewicz, E. (2002). Bradykinin as a major endogenous regulator of endothelial function. *Pediatr Pathol Mol Med*, 21(3), 279-290.
- Guo, W., Adachi, T., Matsui, R., Xu, S., Jiang, B., Zou, M. H., et al. (2003). Quantitative assessment of tyrosine nitration of manganese superoxide dismutase in angiotensin II-infused rat kidney. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285(4), H1396-1403.
- Guyton, A. C., et Hall, J. E. (2003). *Précis de physiologie médicale*. (2<sup>e</sup> éd.). Padoue, Italie: Piccin.
- Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., et Holbrook, N. J. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem*, 271(8), 4138-4142.
- Hahn, A. W., Resink, T. J., Scott-Burden, T., Powell, J., Dohi, Y., et Buhler, F. R. (1990). Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul.*, 1(9), 649-659.
- Hall, J. M. (1992). Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol.Ther.*, 56(2), 131-190.
- Haystead, T. A., Dent, P., Wu, J., Haystead, C. M., et Sturgill, T. W. (1992). Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett*, 306(1), 17-22.
- Hefti, M. A., Harder, B. A., Eppenberger, H. M., et Schaub, M. C. (1997). Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J.Mol.Cell Cardiol.*, 29(11), 2873-2892.
- Higashimori, K., Gante, J., Holzemann, G., et Inagami, T. (1991). Significance of vascular renin for local generation of angiotensins. *Hypertension*, 17(3), 270-277.
- Hirata, Y., Emori, T., Eguchi, S., Kanno, K., Imai, T., Ohta, K., et al. (1993). Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest*, 91(4), 1367-1373.
- Hong, H. J., Chan, P., Liu, J. C., Juan, S. H., Huang, M. T., Lin, J. G., et al. (2004). Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc.Res.*, 61(1), 159-168.
- Hutchison, F. N., Webster, S. K., et Jaffa, A. A. (1993). Altered renal kallikrein and renin gene expression in nephrotic rats and modulation by converting enzyme inhibition. *J.Clin.Invest*, 92(2), 1073-1079.
- Ignjatovic, T., Tan, F., Brovkovich, V., Skidgel, R. A., et Erdos, E. G. (2002). Activation of bradykinin B1 receptor by ACE inhibitors. *Int.Immunopharmacol.*, 2(13-14), 1787-1793.

- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K., et al. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(8), 2863-2867.
- Ishida, Y., Kawahara, Y., Tsuda, T., Koide, M., et Yokoyama, M. (1992). Involvement of MAP kinase activators in angiotensin II-induced activation of MAP kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 310(1), 41-45.
- Ismael, M. A., Talbot, S., Carbonneau, C. L., Beausejour, C. M., et Couture, R. (2008). Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur J Pharmacol*, 589(1-3), 66-72.
- Itoh, H., Mukoyama, M., Pratt, R. E., Gibbons, G. H., et Dzau, V. J. (1993). Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J.Clin.Invest*, 91(5), 2268-2274.
- Jaffa, A. A., Chai, K. X., Chao, J., Chao, L., et Mayfield, R. K. (1992). Effects of diabetes and insulin on expression of kallikrein and renin genes in the kidney. *Kidney Int.*, 41(4), 789-795.
- Jaffa, A. A., Vio, C., Velarde, V., LeRoith, D., et Mayfield, R. K. (1997). Induction of renal kallikrein and renin gene expression by insulin and IGF-I in the diabetic rat. *Diabetes*, 46(12), 2049-2056.
- Kedzierski, R. M., et Yanagisawa, M. (2001). Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 851-876.
- Keynan, S., Khamaisi, M., Dahan, R., Barnes, K., Jackson, C. D., Turner, A. J., et al. (2004). Increased expression of endothelin-converting enzyme-1c isoform in response to high glucose levels in endothelial cells. *J.Vasc.Res.*, 41(2), 131-140.
- Kimes, B. W., et Brandt, B. L. (1976). Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp Cell Res*, 98(2), 349-366.
- Kintsurashvili, E., Duka, I., Gavras, I., Johns, C., Farmakiotis, D., et Gavras, H. (2001). Effects of ANG II on bradykinin receptor gene expression in cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 281(4), H1778-H1783.
- Kuzkaya, N., Weissmann, N., Harrison, D. G., et Dikalov, S. (2003). Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 278(25), 22546-22554.
- Kyriakis, J. M., et Avruch, J. (1996). Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays*, 18(7), 567-577.



- Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S. R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S. M., et al. (2003). Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*, 111(8), 1201-1209.
- Laplanche, M. A., et de Champlain, J. (2006). The interrelation of the angiotensin and endothelin systems on the modulation of NAD(P)H oxidase. *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 84(1), 21-28.
- Laplanche, M. A., Wu, R., Moreau, P., et de Champlain, J. (2005). Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats. *Free Radic.Biol.Med.*, 38(5), 589-596.
- Large, W. A. (2002). Receptor-operated Ca<sup>2+</sup>(+)-permeable nonselective cation channels in vascular smooth muscle: a physiologic perspective. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 13(5), 493-501.
- Larrivée, J. F., Bachvarov, D. R., Houle, F., Landry, J., Huot, J., et Marceau, F. (1998). Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. *J.Immunol.*, 160(3), 1419-1426.
- Lassègue, B., et Clempus, R. E. (2003). Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285(2), R277-297.
- Lassègue, B., et Griendling, K. K. (2004). Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens*, 17(9), 852-860.
- Lavrentyev, E. N., Estes, A. M., et Malik, K. U. (2007). Mechanism of high glucose induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.*, 101(5), 455-464.
- Lee, M. E., de la Monte, S. M., Ng, S. C., Bloch, K. D., et Quertermous, T. (1990). Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *J Clin Invest*, 86(1), 141-147.
- Leeb-Lundberg, L. M., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D. J., et Zuraw, B. L. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol.Rev.*, 57(1), 27-77.
- Lefkowitz, R. J., Pitcher, J., Krueger, K., et Daaka, Y. (1998). Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol*, 42, 416-420.
- Lévesque, L., Drapeau, G., Grose, J. H., Rioux, F., et Marceau, F. (1993). Vascular mode of action of kinin B1 receptors and development of a cellular model for the investigation of these receptors. *Br.J.Pharmacol.*, 109(4), 1254-1262.

- Lewis, E. J., Hunsicker, L. G., Bain, R. P., et Rohde, R. D. (1993). The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N.Engl.J.Med.*, 329(20), 1456-1462.
- Li, J. M., et Shah, A. M. (2004). Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287(5), R1014-1030.
- Li, L., Fink, G. D., Watts, S. W., Northcott, C. A., Galligan, J. J., Pagano, P. J., et al. (2003). Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation*, 107(7), 1053-1058.
- Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., et al. (1993). Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature*, 363(6424), 85-88.
- Lopez-Ongil, S., Saura, M., Zaragoza, C., Gonzalez-Santiago, L., Rodriguez-Puyol, M., Lowenstein, C. J., et al. (2002). Hydrogen peroxide regulation of bovine endothelin-converting enzyme-1. *Free Radic Biol Med*, 32(5), 406-413.
- Lungu, C., Dias, J. P., França, C. E., Ongali, B., Regoli, D., Moldovan, F., et al. (2007). Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides*, 41(6), 375-387.
- Lyle, A. N., et Griendling, K. K. (2006). Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)*, 21, 269-280.
- Macdonald, S. G., Crews, C. M., Wu, L., Driller, J., Clark, R., Erikson, R. L., et al. (1993). Reconstitution of the Raf-1-MEK-ERK signal transduction pathway in vitro. *Mol Cell Biol*, 13(11), 6615-6620.
- Marceau, F. (1995). Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology*, 30(1), 1-26.
- Marceau, F., Hess, J. F., et Bachvarov, D. R. (1998). The B1 receptors for kinins. *Pharmacol.Rev.*, 50(3), 357-386.
- Marieb, E. N. (2008). *Biologie humaine : principes d'anatomie et de physiologie*. (2<sup>e</sup> éd.). Saint Laurent, Paris: ERPI ; Pearson Education France.
- Mathis, S. A., Criscimagna, N. L., et Leeb-Lundberg, L. M. (1996). B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol.Pharmacol.*, 50(1), 128-139.
- Maturana, A. D., Casal, A. J., Demarex, N., Vallotton, M. B., Capponi, A. M., et Rossier, M. F. (1999). Angiotensin II negatively modulates L-type calcium channels through a pertussis toxin-sensitive G protein in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem*, 274(28), 19943-19948.
- McCormick, F. (1994). Activators and effectors of ras p21 proteins. *Curr Opin Genet Dev*, 4(1), 71-76.

- McLean, P. G., Perretti, M., et Ahluwalia, A. (1999). Inducible expression of the kinin B1 receptor in the endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg9bradykinin-induced coronary vasodilation. *Br.J.Pharmacol.*, 128(2), 275-282.
- McLean, P. G., Perretti, M., et Ahluwalia, A. (2000). Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc.Res.*, 48(2), 194-210.
- Mehta, P. K., et Griendling, K. K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, 292(1), C82-C97.
- Meneshian, A., et Bulkley, G. B. (2002). The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation*, 9(3), 161-175.
- Migliore, L., et Coppede, F. (2002). Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutat Res*, 512(2-3), 135-153.
- Molloy, C. J., Taylor, D. S., et Weber, H. (1993). Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 268(10), 7338-7345.
- Momose, N., Fukuo, K., Morimoto, S., et Ogihara, T. (1993). Captopril inhibits endothelin-1 secretion from endothelial cells through bradykinin. *Hypertension*, 21(6 Pt 2), 921-924.
- Moncada, S., Palmer, R. M., et Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43(2), 109-142.
- Moncada, S., et Vane, J. R. (1978). Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin. *Pharmacol Rev*, 30(3), 293-331.
- Moodie, S. A., Willumsen, B. M., Weber, M. J., et Wolfman, A. (1993). Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science*, 260(5114), 1658-1661.
- Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R. E., et Dzau, V. J. (1993). Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J.Biol.Chem.*, 268(33), 24539-24542.
- Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S., et Bernstein, K. E. (1991). Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature*, 351(6323), 233-236.
- Naidu, P. S., Velarde, V., Kappler, C. S., Young, R. C., Mayfield, R. K., et Jaffa, A. A. (1999). Calcium-calmodulin mediates bradykinin-induced MAPK phosphorylation and c-fos induction in vascular cells. *Am.J.Physiol*, 277(3 Pt 2), H1061-H1068.

- Ni, A., Chao, L., et Chao, J. (1998). Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J.Biol.Chem.*, 273(5), 2784-2791.
- Ongali, B., Buck, H. S., Cloutier, F., Legault, F., Regoli, D., Lambert, C., et al. (2003). Chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on kinin receptor binding sites in the rat spinal cord. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 284(6), H1949-H1958.
- Ortiz, P. A., et Garvin, J. L. (2003). Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284(3), R628-638.
- Oudit, G. Y., Sun, H., Kerfant, B. G., Crackower, M. A., Penninger, J. M., et Backx, P. H. (2004). The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol*, 37(2), 449-471.
- Pesquero, J. B., Araujo, R. C., Heppenstall, P. A., Stucky, C. L., Silva, J. A., Jr., Walther, T., et al. (2000). Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97(14), 8140-8145.
- Petcu, M., Ongali, B., El Midaoui, A., de Champlain, J., et Couture, R. (2005). Effects of alpha-lipoic acid on kinin B1 and B2 receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. *Peptides*, 26(8), 1331-1338.
- Pham, F. H., Cole, S. M., et Clerk, A. (2001). Regulation of cardiac myocyte protein synthesis through phosphatidylinositol 3' kinase and protein kinase B. *Adv Enzyme Regul*, 41, 73-86.
- Pinet, F. (2004). [What is the role of endothelin system?]. *Med.Sci.(Paris)*, 20(3), 339-345.
- Prado, G. N., Taylor, L., Zhou, X., Ricupero, D., Mierke, D. F., et Polgar, P. (2002). Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J.Cell Physiol*, 193(3), 275-286.
- Pruneau, D., Luccarini, J. M., Defrene, E., Paquet, J. L., et Belichard, P. (1996). Characterisation of bradykinin receptors from juvenile pig coronary artery. *Eur.J.Pharmacol.*, 297(1-2), 53-60.
- Puddu, P., Puddu, G. M., Cravero, E., Rosati, M., et Muscari, A. (2008). The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. *Blood Press*, 17(2), 70-77.
- Pueyo, M. E., Gonzalez, W., Nicoletti, A., Savoie, F., Arnal, J. F., et Michel, J. B. (2000). Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(3), 645-651.
- Rabelink, T. J., Kaasjager, K. A., Boer, P., Stroes, E. G., Braam, B., et Koomans, H. A. (1994). Effects of endothelin-1 on renal function in humans: implications for physiology and pathophysiology. *Kidney Int*, 46(2), 376-381.

- Rameh, L. E., et Cantley, L. C. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem*, 274(13), 8347-8350.
- Regoli, D., et Barabé, J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol.Rev.*, 32(1), 1-46.
- Regoli, D., Barabé, J., et Park, W. K. (1977). Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 55(4), 855-867.
- Remuzzi, G., Perico, N., et Benigni, A. (2002). New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. *Nat.Rev.Drug Discov.*, 1(12), 986-1001.
- Rhee, S. G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem*, 70, 281-312.
- Rich, S., et McLaughlin, V. V. (2003). Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. *Circulation*, 108(18), 2184-2190.
- Rizzi, A., Calo, G., Amadesi, S., et Regoli, D. (1997). Kinin B1 and B2 receptors in pig vessels: characterization of two monoreceptor systems. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, 356(5), 662-670.
- Robin, P., Boulven, I., Desmyter, C., Harbon, S., et Leiber, D. (2002). ET-1 stimulates ERK signaling pathway through sequential activation of PKC and Src in rat myometrial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283(1), C251-260.
- Rosen, B., Barg, J., et Zimlichman, R. (1999). The effects of angiotensin II, endothelin-1, and protein kinase C inhibitor on DNA synthesis and intracellular calcium mobilization in vascular smooth muscle cells from young normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 12(12 Pt 1-2), 1243-1251.
- Rubanyi, G. M., et Botelho, L. H. (1991). Endothelins. *FASEB J*, 5(12), 2713-2720.
- Ruef, J., Moser, M., Kubler, W., et Bode, C. (2001). Induction of endothelin-1 expression by oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Pathol*, 10(6), 311-315.
- Ryan, J. W., Berryer, P., Chung, A. Y., et Sheffy, D. H. (1994). Characterization of rat pulmonary vascular aminopeptidase P in vivo: role in the inactivation of bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther*, 269(3), 941-947.
- Saito, M., Nishi, K., Fukumoto, Y., Weiss, R. M., et Latifpour, J. (1996). Characterization of endothelin receptors in streptozotocin-induced diabetic rat vas deferens. *Biochem.Pharmacol.*, 52(10), 1593-1598.
- Saito, Y., et Berk, B. C. (2001). Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol*, 33(1), 3-7.
- Sakai, S., Miyauchi, T., Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Goto, K., et Sugishita, Y. (1996). Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature*, 384(6607), 353-355.

- Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K., et al. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, 348(6303), 732-735.
- Salamanca, D. A., et Khalil, R. A. (2005). Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochem Pharmacol*, 70(11), 1537-1547.
- Saleh, S. N., Albert, A. P., Peppiatt, C. M., et Large, W. A. (2006). Angiotensin II activates two cation conductances with distinct TRPC1 and TRPC6 channel properties in rabbit mesenteric artery myocytes. *J Physiol*, 577(Pt 2), 479-495.
- Sardi, S. P., Perez, H., Antunez, P., et Rothlin, R. P. (1997). Bradykinin B1 receptors in human umbilical vein. *Eur.J.Pharmacol.*, 321(1), 33-38.
- Schanstra, J. P., Marin-Castano, M. E., Alric, C., Pesquero, J. B., Claire, M., Girolami, J. P., et al. (1999). Homologous and heterologous induction of the human bradykinin B1-receptor and B1-receptor localisation along the rat nephron. *Immunopharmacology*, 45(1-3), 29-34.
- Schiffrin, E. L. (1995). Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension*, 25(6), 1135-1143.
- Schiffrin, E. L. (2005). Vascular endothelin in hypertension. *Vascul.Pharmacol.*, 43(1), 19-29.
- Schmaier, A. H. (2003). The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 285(1), R1-13.
- Seger, R., et Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 9(9), 726-735.
- Seshiah, P. N., Weber, D. S., Rocic, P., Valppu, L., Taniyama, Y., et Griendling, K. K. (2002). Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ.Res.*, 91(5), 406-413.
- Sherwood, L. (2004). *Human physiology : from cells to systems*. (5<sup>e</sup> éd.). Australia ; Canada: Thomson : Brooks/Cole.
- Siragy, H. M., et Carey, R. M. (1996). The subtype-2 (AT2) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT1 receptor-mediated prostaglandin E2 production in conscious rats. *J.Clin.Invest*, 97(8), 1978-1982.
- Skidgel, R. A., Stanisavljevic, S., et Erdos, E. G. (2006). Kinin- and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor-mediated nitric oxide production in endothelial cells. *Biol.Chem.*, 387(2), 159-165.
- Smith, J. A., Webb, C., Holford, J., et Burgess, G. M. (1995). Signal transduction pathways for B1 and B2 bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Mol.Pharmacol.*, 47(3), 525-534.

- Srivastava, A. K. (2002). High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: a potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes (review). *Int J Mol Med*, 9(1), 85-89.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., et Witztum, J. L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, 320(14), 915-924.
- Takai, M., Umemura, I., Yamasaki, K., Watakabe, T., Fujitani, Y., Oda, K., et al. (1992). A potent and specific agonist, Suc-[Glu<sup>9</sup>,Ala<sup>11</sup>,15]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ETB receptor. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 184(2), 953-959.
- Tang, K. M., Wang, G. R., Lu, P., Karas, R. H., Aronovitz, M., Heximer, S. P., et al. (2003). Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med*, 9(12), 1506-1512.
- Taniyama, Y., et Griendling, K. K. (2003). Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 42(6), 1075-1081.
- Tanus-Santos, J. E., Gordo, W. M., Francisco-DoPrado, J., Sampaio, R. C., et Moreno, H. (2000). Endothelin-1 attenuates bradykinin-induced hypotension in rats. *Eur.J.Pharmacol.*, 397(2-3), 367-371.
- Tham, D. M., Martin-McNulty, B., Wang, Y. X., Wilson, D. W., Vergona, R., Sullivan, M. E., et al. (2002). Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs. *Physiol Genomics*, 11(1), 21-30.
- Tom, B., Dendorfer, A., et Danser, A. H. (2003). Bradykinin, angiotensin-(1-7), and ACE inhibitors: how do they interact? *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 35(6), 792-801.
- Touyz, R. M. (2005). Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol*, 90(4), 449-455.
- Touyz, R. M., He, G., Deng, L. Y., et Schiffrin, E. L. (1999). Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation*, 99(3), 392-399.
- Touyz, R. M., et Schiffrin, E. L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol.Rev.*, 52(4), 639-672.
- Treschan, T. A., et Peters, J. (2006). The vasopressin system: physiology and clinical strategies. *Anesthesiology*, 105(3), 599-612; quiz 639-540.
- Tsutsui, M. (2004). Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor. *J Atheroscler Thromb*, 11(2), 41-48.
- Uddin, M., Yang, H., Shi, M., Polley-Mandal, M., et Guo, Z. (2003). Elevation of oxidative stress in the aorta of genetically hypertensive mice. *Mech Ageing Dev*, 124(7), 811-817.

- Vane, J. R., et Botting, R. M. (1995). Pharmacodynamic profile of prostacyclin. *Am J Cardiol*, 75(3), 3A-10A.
- Vanhoutte, P. M. (1989). Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*, 13(6 Pt 2), 658-667.
- Vanhoutte, P. M. (2000). Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst*, 81(1-3), 271-277.
- Vecchione, C., Patrucco, E., Marino, G., Barberis, L., Poulet, R., Aretini, A., et al. (2005). Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3Kgamma. *J Exp Med*, 201(8), 1217-1228.
- Vidal, M. J., Romero, J. C., et Vanhoutte, P. M. (1988). Endothelium-derived relaxing factor inhibits renin release. *Eur J Pharmacol*, 149(3), 401-402.
- Weber, H., Taylor, D. S., et Molloy, C. J. (1994). Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells. Correlation with the expression of specific endogenous growth factors and reversal by suramin. *J Clin Invest*, 93(2), 788-798.
- Weber, H., Webb, M. L., Serafino, R., Taylor, D. S., Moreland, S., Norman, J., et al. (1994). Endothelin-1 and angiotensin-II stimulate delayed mitogenesis in cultured rat aortic smooth muscle cells: evidence for common signaling mechanisms. *Mol Endocrinol*, 8(2), 148-158.
- Wetzker, R., et Bohmer, F. D. (2003). Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(8), 651-657.
- Wiemer, G., et Wirth, K. (1992). Production of cyclic GMP via activation of B1 and B2 kinin receptors in cultured bovine aortic endothelial cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 262(2), 729-733.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., et al. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332(6163), 411-415.
- Yang, H., Shi, M., VanRemmen, H., Chen, X., Vijg, J., Richardson, A., et al. (2003). Reduction of pressor response to vasoconstrictor agents by overexpression of catalase in mice. *Am J Hypertens*, 16(1), 1-5.
- Yau, L., Pinsk, M., et Zahradka, P. (1996). Inhibition of RNA synthesis by bradykinin involves both the B1 and B2 receptor subtypes. *Arch.Biochem.Biophys.*, 328(1), 115-121.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 74(1), 139-162.
- Zafarullah, M., Li, W. Q., Sylvester, J., et Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol.Life Sci.*, 60(1), 6-20.
- Zheng, J. S., Yang, X. Q., Lookingland, K. J., Fink, G. D., Hesslinger, C., Kapatos, G., et al. (2003). Gene transfer of human guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I



restores vascular tetrahydrobiopterin level and endothelial function in low renin hypertension. *Circulation*, 108(10), 1238-1245.

Zhou, X., Polgar, P., et Taylor, L. (1998). Roles for interleukin-1beta, phorbol ester and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B1 receptor gene expression. *Biochem.J.*, 330 ( Pt 1), 361-366.

